



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **SISTEMA RANKL/RANK/OPG E O SEU PAPEL NA REABSORÇÃO ÓSSEA NA PERIODONTITE CRÓNICA**

Trabalho submetido por  
**Patrícia Ferreira Dias**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**junho de 2016**



# **INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ**

## **MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

### **SISTEMA RANKL/RANK/OPG E O SEU PAPEL NA REABSORÇÃO ÓSSEA NA PERIODONTITE CRÓNICA**

Trabalho submetido por  
**Patrícia Ferreira Dias**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Prof. Doutor Carlos Monteiro**

e coorientado por  
**Mestre Filipa Jourdan**

**junho de 2016**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, as pessoas mais importantes da minha vida. Tudo o que sou, devo-vos a vocês, são o melhor de mim. Deram-me todas as oportunidades, ajudaram-me, apoiaram-me e impulsionaram-me a fazer sempre mais e melhor; a nunca desistir e a lutar pelos meus objetivos com garra e ambição até ao fim. Obrigada por toda a compreensão, carinho e amor que, mesmo estando longe, me proporcionam todos os dias. Sem o vosso apoio incondicional todo este caminho teria sido mais difícil e doloroso. Obrigada por serem quem são e por terem acreditado sempre em mim.

Adoro-vos, do fundo do coração.

*Para ser grande, sê inteiro: nada  
Teu exagera ou exclui.  
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és  
No mínimo que fazes.  
Assim em cada lago a lua toda  
Brilha, porque alta vive*

Ricardo Reis



## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, ao meu orientador Professor Doutor Carlos Monteiro, por toda a ajuda e disponibilidade cedida, por toda a paciência e por ter tornado este desafio mais fácil de ser superado.

À minha co-orientadora, Mestre Filipa Jourdan, que se mostrou sempre acessível para responder às minhas questões e auxiliar-me em tudo o que precisei, e por todo o apoio que me deu.

À Professora Doutora Guilhermina Moutinho, que apesar do seu nome não estar no papel, aconselhou-me e nunca hesitou em ajudar-me.

A todos os professores do ISCSEM, por todo o conhecimento que me transmitiram ao longo destes cinco anos, por terem aumentado o meu amor pela Medicina Dentária e me impulsionarem a querer saber mais, descobrir mais, a ser uma profissional de saúde cada vez melhor.

Aos meus pais. Nunca é demais agradecer-vos, chega mesmo a ser impossível agradecer-vos o suficiente. Não existe papel no mundo que chegue para explicar a minha gratidão. Para sempre em dívida convosco.

À Carolina Almeida, minha prima, companheira de casa e, mais que isso, irmã. Obrigada pelo apoio gigante e por teres tornado mais fáceis estes cinco anos de faculdade. Não existe ninguém tão bondosa como tu. Os momentos que partilhámos são memórias que levo para a vida.

Aos meus melhores amigos, Ana Santos e Ricardo Oliveira. Já perdi a conta aos anos em que me levantam sempre que eu caio e aturam as minhas neuras nos meus momentos de loucura. Obrigada por todo o apoio. São a família que escolhi.

À Sofia Correia, por teres partilhado comigo a tua energia e loucura quando mais precisava.

À Liliana Gonçalves, pela amizade e carinho nestes cinco anos. És para a vida. À Inês Santos, a minha parceira de box, pelo companheirismo principalmente nestes últimos dois anos. À Catarina Patinha, a minha companheira de biblioteca, a tua companhia bem-disposta ajudou que estes últimos meses tivessem passado mais facilmente.

Por fim, a todos aqueles que, de uma maneira ou de outra, ajudaram no meu crescimento académico e pessoal.





## RESUMO

A periodontite crónica é uma doença complexa e multifatorial caracterizada por uma resposta inflamatória crónica dos tecidos de suporte do dente, resultando na destruição progressiva do tecido conjuntivo periodontal e osso alveolar. Esta resposta inflamatória é iniciada pelos agentes patogénicos periodontais e desencadeia a resposta imunitária do hospedeiro, através de inúmeros mediadores pró-inflamatórios.

Alguns destes mediadores atuam na regulação da atividade dos osteoclastos, as principais células responsáveis pela destruição óssea. A proteína RANKL (ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B) e os seus dois recetores RANK (recetor ativador do fator nuclear kappa B) e OPG (osteoprotegerina) apresentam papéis fundamentais na biologia dos osteoclastos, sendo que a interação RANKL/RANK é essencial para a estimulação da osteoclastogénese e promoção da reabsorção óssea. Esta interação leva ao recrutamento de fatores associados ao recetor TNF (TRAFs), nomeadamente o TRAF6, que desencadeia a ativação de algumas vias de sinalização principais – NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B), JNK (quinase N-terminal Jun), ERK (quinase regulada por sinal extracelular), p38, NFATc1 (fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1) e Akt (proteína quinase B) – na regulação da formação, função e/ou sobrevivência osteoclástica. Por outro lado, a interação RANKL/OPG inibe a estimulação da osteoclastogénese, inibindo assim a reabsorção óssea.

A perda óssea alveolar é a principal característica da periodontite, pelo que a sua prevenção é o desafio clínico chave no tratamento da doença. Deste modo, torna-se de extrema importância adquirir conhecimento sobre os mecanismos moleculares e celulares envolvidos no sistema RANKL/RANK/OPG, de modo a tornar possível a criação de novos princípios farmacológicos para a inibição da reabsorção excessiva em condições patológicas, como é o caso da periodontite crónica.

Com este trabalho de projeto final pretende-se, através da revisão da literatura existente, estudar quais os mecanismos de reabsorção óssea associados à periodontite crónica, dando especial destaque nos mecanismos envolvidos com o sistema RANKL/RANK/OPG.

*Palavras-chave: periodontite, reabsorção óssea, sistema RANKL/RANK/OPG*





## ABSTRACT

Chronic Periodontitis is a complex and multifactorial disease characterized by a chronic inflammatory response of the supporting tissues of the tooth, resulting in the progressive destruction of the periodontal connective tissue and alveolar bone, this inflammatory response is started by the periodontal pathogens and triggers the immunity response of the host, through several proinflammatory mediators.

Some of these mediators regulate the activity of osteoclasts, the main cells responsible for bone destruction. The RANKL protein (ligando of the receptor that activates nuclear factor kappa B) and its two receptors RANK (activating receptor of the nuclear factor kappa B) and OPG (osteoprotegerin) have crucial roles in the biology of the oestoclasts. The interaction RANKL/RANK is essential for the stimulation of the osteoclastogenesis and bone reabsorption. The interaction leads to the recruitment of factos associated to receptor TNF (TRAFs), in particular TRAF6, which leads to the activity of some of the key signaling ways - NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa B), JNK (kinase N-terminal Jun), ERK (kinase regulated by extracellular signals), p38 NFATc1 (nuclear factor of activated T-cell cytoplasmic 1) and Akt (protein kinase B) – in the regulation of formation, function and or either osteoclastic survival. Moreover, RANKL/OPG interaction inhibits stimulation of osteoclastogenesis, thereby inhibiting bone resorption.

Alveolar bone loss is the main characteristic of periodontitis and therefore its prevention is the key challenge in the clinic treatment of the disease. Thus, it is of utmost importance to build knowledge on the molecular and cellular mechanisms involved in the RANKL/RANK/OPG pathway in order to create new pharmacological principles for inhibiting excessive resorption in pathologic conditions, such as case of chronic periodontitis.

With this thesis we intend to review the current state of the art to study which bone resorption mechanisms are associated with chronic periodontitis, with special emphasis on the mechanisms involved in the system RANKL/RANK/OPG.

*Key words: periodontitis, bone resorption, RANKL/RANK/OPG pathway*



# ÍNDICE

I.	INTRODUÇÃO.....	11
II.	DESENVOLVIMENTO.....	14
	1.Doença Periodontal.....	14
	1.1.Definição .....	14
	1.2.Epidemiologia.....	14
	1.3.Fatores de risco.....	15
	1.4.Características clínicas .....	15
	1.5.Etiologia .....	17
	1.5.1.Placa bacteriana e microflora associada .....	17
	1.5.2.Resposta imune do hospedeiro .....	19
	2.Tecido Ósseo .....	21
	2.1.Osso alveolar .....	21
	2.2.Componente extracelular.....	22
	2.3.Componente celular.....	22
	2.3.1.Osteoblastos.....	22
	2.3.2.Osteoclastos .....	23
	2.3.2.1.Diferenciação osteoclástica .....	23
	2.4.Remodelação óssea.....	24
	2.5.Reabsorção óssea.....	26
	2.5.1.Reabsorção óssea na periodontite.....	29
	3.Sistema RANKL/RANK/OPG .....	30
	3.1.Recetor ativador do fator nuclear kappa B .....	30
	3.2.Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B .....	31
	3.3.Osteoprotegerina.....	32
	3.4.Vias ativadas pelo o sistema RANKL/RANK/OPG.....	33

3.4.1.Fator associado ao recetor TNF 6 .....	33
3.4.2.Quinases ativadas por mitogénios .....	35
3.5.1.Fator nuclear kappa B.....	35
3.5.2.Fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1 .....	36
3.5.3.Proteína quinase B .....	38
3.6.Fatores que influenciam a expressão de RANKL .....	39
3.6.1.Mediadores inflamatórios .....	39
3.6.1.1.Interleucina 1 beta, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa. .....	40
3.6.2.Infiltrado inflamatório celular .....	41
3.6.2.1.Neutrófilos .....	41
3.6.2.2.Células T e B .....	41
3.6.3.Biofilme subgengival e fatores de virulência microbial.....	44
3.6.3.1.Lipopolissacarídeos .....	44
3.7.Rácio RANKL/OPG na periodontite.....	45
3.8... Terapêuticas farmacológicas com o sistema RANKL/RANK/OPG como alvo .....	48
III.CONCLUSÃO.....	51
IV.BIBLIOGRAFIA.....	52

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Diferenças no periodonto em condições de saúde e na periodontite .....	16
Figura 2 - Aspeto clínico da periodontite crónica .....	16
Figura 3 - Modelo da sinergia polimicrobiana e disbiose .....	18
Figura 4 - Etiopatogénese da periodontite .....	20
Figura 5 - Osso cortical e osso trabecular .....	21
Figura 6 - Origem e formação osteoclástica .....	24
Figura 7 - Quatro fases da remodelação óssea .....	26
Figura 8 - Domínios funcionais e mecanismos de reabsorção óssea no osteoclasto .....	28
Figura 9 - Relação espacial entre a frente inflamatória e a reabsorção óssea alveolar...	29
Figura 10 - Interação RANK/RANKL vs interação OPG/RANKL .....	32
Figura 11- Transduções de sinal a jusante da interação RANK/RANKL. ....	34
Figura 12 - Transdução do sinal do NF- $\kappa$ B .....	36
Figura 13 - Transdução do sinal do NFATc1 .....	38
Figura 14 - Transdução de sinal da Akt.....	39
Figura 15 - Saúde periodontal vs. doença periodontal .....	44
Figura 16 - Diferenças no rácio RANKL/OPG e consequente influência na osteoclastogénese.....	46
Figura 17 - Mecanismo de ação do anticorpo anti-RANKL Denosumab .....	49



## LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1 – proteína ativadora-1

Akt – proteína quinase B

Bad – promotor de morte associado ao Bcl-2

BMU – unidade básica multicelular

CAII – anidrase carbónica II

CFU-GM – unidades formadoras de colónias de granulócitos/macrófagos

CFU-M – unidades formadoras de colónias de macrófagos

CMP – células progenitoras mieloides comuns (do inglês: *common myeloid progenitors*)

CREB – proteína de ligação ao elemento de resposta da adenosina monofosfato cíclica

DNA – ácido desoxirribonucleico

ELISA – ensaio imunoenzimático (do inglês: *enzyme-linked immunosorbent assay*)

ERK – quinase regulada por sinal extracelular

FCG – fluido crevicular gengival

GM-CSF – fator estimulador de colónias de granulócitos/macrófagos

HSC – células estaminais hematopoiéticas (do inglês: *hematopoietic stem cells*)

I $\kappa$ B – proteína inibidora de  $\kappa$ B

IKK – I $\kappa$ B quinase

IFN- $\gamma$  – interferão gama

IL – interleucina

JNK – quinase N-terminal Jun

LIF – fator inibidor de leucemia

LPS – lipopolissacarídeos

M-CSF – fator estimulante de colónias de macrófagos

MAPKs – quinases ativadas por mitógenos

MITF – fator de transcrição associado à microftalmia

MMPs – metaloproteinases de matriz

mRANKL – RANKL ancorado à membrana

MSC – células estaminais mesenquimais

NFATc1 – fator nuclear de células T ativadas c1

NF- $\kappa$ B – fator nuclear kappa B



OCIF – fator inibidor de osteoclastos  
ODF – fator de diferenciação de osteoclastos  
OPG – osteoprotegerina  
OPGL – ligante osteoprotegerina  
OSCAR – recetor associado aos osteoclastos  
OSM – oncostatina M  
PAMPs – padrões moleculares associados a patogêneos  
PC – periodontite crónica  
PNC – proteínas não-colagenosas  
PGE2 – prostaglandina E2  
PI3K – fosfatidilinositol 3 quinase  
PIP3 – fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato  
PMN's – leucócitos polimorfonucleares  
PSD – sinergia microbiana e disbiose (do inglês: *polymicrobial synergy and dysbiosis*)  
PTH – hormona paratiroideia  
RNA – ácido ribonucleico  
RANK – recetor ativador do fator nuclear kappa B  
RANKL – ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B  
SCF – fator de células estaminais  
sRANKL – RANKL solúvel  
TGF- $\beta$  – fator de transformação de crescimento beta  
Th – células T auxiliares  
TLRs – *toll-like receptors*  
TNF – fator de necrose tumoral  
TNFSF-11 – membro 11 da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral  
TRAF – fatores associados ao recetor TNF  
TRANCE – citocina indutora de ativação relacionada com o TNF  
TRAP – fosfatase ácida resistente ao tartarato  
V-H<sup>+</sup>ATPase – H<sup>+</sup>-adenosina trifosfatase do tipo vacuolar

## I. INTRODUÇÃO

A doença periodontal é uma das doenças orais mais prevalentes no mundo, principalmente em idades mais avançadas. A periodontite crónica é a forma mais prevalente de periodontite, sendo uma das maiores causas de perda dentária. Por sua vez, a perda dentária afeta seriamente a qualidade de vida com redução da capacidade funcional, auto-estima e relações sociais (Durham et al., 2013; Newman, Takei, Klokkevold, & Carranza, 2015; Petersen & Ogawa, 2012).

A periodontite é caracterizada como uma doença inflamatória crónica das estruturas de suporte do dente – periodonto – ou seja, a gengiva, o ligamento periodontal, o cemento e o osso alveolar (Kajiya et al., 2010; Pihlstrom, Michalowicz, & Johnson, 2005).

Os agentes patogénicos periodontais são considerados os fatores etiológicos iniciais no desenvolvimento da periodontite, no entanto, não são suficientes para desencadear a doença. De facto, é a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro em resposta ao desafio bacteriano que é responsável pela grande maioria da destruição dos tecidos periodontais (Kajiya et al., 2010; Van Dyke & Kornman, 2008; Van Dyke, 2008).

Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre a microbiota periodontal e a resposta imunológica do hospedeiro, no entanto, quando este equilíbrio fica comprometido, seja por alterações na quantidade ou qualidade do biofilme dentário, modificações na resposta do hospedeiro e/ou mudanças ambientais, é desencadeada uma resposta inflamatória. Quando esta resposta inflamatória não é travada, instala-se um quadro de inflamação crónica, resultando na progressão da periodontite (Richard P Darveau, 2010; Newman et al., 2015; Pihlstrom et al., 2005; Yucel-Lindberg & Båge, 2013).

Esta resposta inflamatória envolve a produção de vários mediadores pró-inflamatórios, que, apesar do seu objetivo ser a eliminação dos agentes patogénicos periodontais causadores de doença, acaba por resultar em grandes danos ao tecido conjuntivo periodontal e osso alveolar. (Hajishengallis & Lamont, 2012; Hajishengallis, 2014)

O osso é um tecido dinâmico que está submetido a uma remodelação contínua, necessária para manter a homeostasia mineral. Em condições fisiológicas, o processo de remodelação óssea apresenta um equilíbrio dinâmico entre formação e reabsorção óssea, no entanto, quando ocorre uma alteração a este equilíbrio, iremos encontrar-nos numa

situação de patologia (Feng & McDonald, 2011; Tabari, Azadmehr, Tabrizi, Hamissi, & Ghaedi, 2013).

A excessiva reabsorção óssea alveolar é a característica mais marcante da periodontite crônica e, se não for travada, pode levar ao aparecimento de mobilidade dentária, resultando, em última instância, na perda dentária. (Cochran, 2008; Petersen & Ogawa, 2012)

Os osteoclastos são as principais células envolvidas na reabsorção óssea, sendo a sua atividade essencial para a modelação e remodelação óssea. O sistema RANKL/RANK/OPG está intimamente ligada à diferenciação e ativação dos osteoclastos, e a sua regulação é essencial para a promoção de reabsorção óssea (Burr & Allen, 2014; Lerner, 2004; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

O RANKL, também conhecido como TNFSF-11 (membro 11 da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral), TRANCE (citoquina indutora de ativação relacionada com o TNF), ODF (fator de diferenciação de osteoclastos) e OPGL (ligante osteoprotegerina), é uma proteína fundamental para a ativação da osteoclastogénese e um importante biomarcador da reabsorção óssea. Na periodontite, o RANKL é expresso maioritariamente pelos linfócitos B e T, mas também é induzido por vários mediadores pró-inflamatórios envolvidos na resposta imunológica do hospedeiro. (Hienz, Paliwal, & Ivanovski, 2015; Lerner, 2004).

A ligação do RANKL ao RANK conduz à ativação de RANK, que leva ao recrutamento de TRAFs, sendo o mais importante o TRAF6. Estes desencadeiam transduções de sinal em cascata, que conduzem à formação e ativação dos osteoclastos: NF- $\kappa$ B, JNK, ERK, p38, NFATc1 e Akt. Estes mediadores estimulam a ativação de genes específicos cruciais para a diferenciação e função osteoclástica, resultando em quadros clínicos de reabsorção óssea (Bilezikian, Raisz, & Martin-Third, 2008; Kim & Kim, 2016; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

No sistema RANKL/RANK/OPG, a OPG liga-se competitivamente ao RANKL, impedindo assim a interação entre RANK/RANKL. Isto traduz-se na inibição da diferenciação osteoclástica e, consequentemente, na diminuição da reabsorção óssea (Yucel-Lindberg & Båge, 2013).

A diminuição da perda óssea alveolar é um dos maiores desafios clínicos da periodontite, e visto que a reabsorção óssea está intimamente relacionada com a regulação do sistema RANKL/RANK/OPG, a investigação e realização de estudos sobre os processos biológicos envolvidos neste sistema são de máxima importância na

aquisição de maior conhecimento e de novas perspectivas sobre a doença, com o objetivo de nos auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades de diagnóstico e terapêuticas (Cochran, 2008; Hienz et al., 2015)

Neste trabalho de projeto final iremos fazer uma revisão bibliográfica da literatura existente, descrevendo detalhadamente a periodontite crónica, abordando temas como a epidemiologia, fatores de risco, características clínicas e etiologia; o tecido ósseo, as suas componentes celular e extracelular e ainda a reabsorção óssea; e por fim, uma revisão detalhada sobre o sistema RANKL/RANK/OPG, e todos os mecanismos nele envolvidos, abordando também possíveis terapias farmacológicas para a periodontite crónica.

Este trabalho tem como objetivo final clarificar a relação entre o sistema RANKL/RANK/OPG e a reabsorção óssea nos quadros clínicos de periodontite crónica.

## **II. DESENVOLVIMENTO**

### **1. Doença Periodontal**

#### **1.1. Definição**

A periodontite crónica (PC) é definida como uma “doença inflamatória dos tecidos de suporte do dente causada por microrganismos específicos ou grupos específicos de microrganismos, resultando numa destruição progressiva do ligamento periodontal e osso alveolar com aumento da profundidade de sondagem, recessão gengival ou ambos” (Flemming, 1999)

De acordo com Lindhe (1999) e Highfield (2009), a PC pode ser classificada quanto à sua distribuição em:

- Localizada – quando menos de 30% das localizações dentárias se encontram afetadas pela doença;
- Generalizada – quando 30% ou mais das localizações dentárias se encontram afetadas pela doença.

Quando à severidade:

- Leve – até 2mm de perda de inserção clínica (IC);
- Moderada – entre 3-4mm de perda de IC;
- Severa – 5mm ou mais de perda de IC.

#### **1.2. Epidemiologia**

A periodontite é uma das doenças crónicas mais comuns no mundo, chegando a afetar 750 milhões de pessoas. Apresenta uma prevalência de 50% nos adultos, no entanto este valor aumenta com o avanço da idade, chegando a atingir valores entre 70-90% em indivíduos com idades compreendidas entre 60-74 anos. Embora seja registada mais frequentemente em adultos e idosos, também pode ocorrer em crianças e adolescentes como consequência da acumulação crónica de placa bacteriana e tártaro (Newman et al., 2015; G. P. Wang, 2015).

Juntamente com a cárie dentária, é uma das doenças orais mais prevalentes, sendo também uma das maiores causas de perda dentária. Afeta diretamente a qualidade de vida dos seus portadores, com redução da capacidade funcional, auto-estima e relações sociais (Durham et al., 2013; Petersen & Ogawa, 2012).

A periodontite crónica é a forma mais prevalente de periodontite. É considerada uma doença com uma taxa de progressão lenta a moderada, mas pode ter períodos de

progressão rápida. Geralmente é indolor, e pode passar despercebida até ser feito o exame clínico e radiográfico periodontal pelo médico dentista, pelo que pode ser considerado uma doença silenciosa (Highfield, 2009; Newman et al., 2015).

### **1.3. Fatores de risco**

São vários os fatores de risco para a periodontite, e estes podem ser divididos em locais e sistêmicos. Dos fatores locais fazem parte a presença de placa bacteriana e tártaro, inflamação gengival, restaurações defeituosas e trauma oclusal. Dentro dos fatores sistêmicos, estão incluídos o tabaco, condições médicas como a diabetes, infecção por HIV, stress psicológico, osteoporose, obesidade e consumo insuficiente de cálcio e vitamina D, podendo muitos destes serem controlados, modificados ou até eliminados. No entanto, existem certos fatores de risco que não podem ser alterados, como o aumento da idade, o sexo masculino e a predisposição genética (Genco & Borgnakke, 2013; Highfield, 2009; Kye, Davidson, Martin, & Engebretson, 2012). Dos fatores acima mencionados, o tabaco e a diabetes consideram-se os fatores de risco principais para a periodontite (Kye et al., 2012).

### **1.4. Características clínicas**

Clinicamente, um paciente com periodontite não tratada pode apresentar acumulação placa bacteriana supra e infragengival (frequentemente acompanhada pela presença de cálculo dentário), tecido gengival edemaciado e com maior tendência a hemorragia, aumento da sensibilidade, perda de inserção conjuntiva, formação de bolsas periodontais, recessão gengival e perda óssea alveolar irreversível (Figura 1 e 2) (Antonini, Cancellier, Ferreira, & Scaini, 2013; Newman et al., 2015).

Por vezes, especialmente nos pacientes com boas práticas de higiene oral, as alterações de cor, consistência e contorno relacionadas com a inflamação gengival podem não ser visíveis, sendo que a inflamação pode ser detetada apenas pelo sangramento das bolsas periodontais quando se realiza o exame clínico periodontal. A hemorragia pode ser acompanhada de supuração e aumento do fluxo de exsudados associados à inflamação (Highfield, 2009).

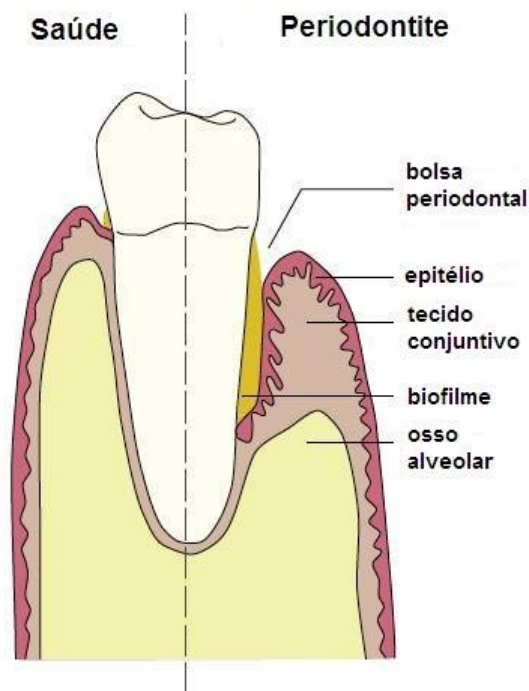


Figura 1- Diferenças no periodonto em condições de saúde (esquerda) e na periodontite (direita). Em quadros clínicos de periodontite, ocorre perda de inserção periodontal, formação de bolsas periodontais com presença de biofilme e perda óssea alveolar. (Adaptado a partir de Yucel-Lindberg & Båge, 2013)



Figura 2 - Aspeto clínico da periodontite crônica. Podemos observar recessão gengival e perda óssea generalizada. (Adaptado a partir de Ohlrich et al., 2009)

O padrão de reabsorção óssea alveolar tanto pode ser horizontal como vertical (ou angular), no entanto a primeira situação é a mais comum. No padrão horizontal, a perda óssea ocorre uniformemente na maioria das faces ósseas, enquanto o padrão vertical se manifesta quando a perda óssea é maior numa superfície dentária que na adjacente. Quando a reabsorção óssea é muito extensa, como é frequente acontecer nos

quadros mais severos, pode levar ao aparecimento de mobilidade dentária. Esta mobilidade pode conduzir, em última instância, à perda dentária (Newman et al., 2015; Petersen & Ogawa, 2012; Yucel-Lindberg & Båge, 2013).

### 1.5. Etiologia

A PC é uma doença multifatorial, em que o equilíbrio normal entre a microbiota subgengival e a resposta imune do hospedeiro está comprometido. Uma alteração a este equilíbrio pode ocorrer devido a mudanças na quantidade/qualidade do biofilme dentário, mudanças na resposta do hospedeiro, influências ambientais/comportamentais ou uma combinação das anteriores (Richard P Darveau, 2010; Ohlrich, Cullinan, & Seymour, 2009; Pihlstrom et al., 2005)

#### 1.5.1. Placa bacteriana e microflora associada

Durante várias décadas acreditou-se que a patogénese da periodontite era atribuída a microrganismos específicos, como o “complexo vermelho”, – descoberto por Socransky (1998) – constituído por três espécies predominantes: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*.

No entanto, avanços recentes no domínio da investigação na área da periodontologia demonstraram que o biofilme periodontal é muito mais heterogéneo e diversificado do que se pensava, contando com mais de 700 microrganismos (a maioria gram-negativos anaeróbios) que podem ser reconhecidos como constituintes da microbiota periodontal (Antonini et al., 2013; G. Hajishengallis & Lamont, 2012). Estes conhecimentos conduziram à elaboração de novos modelos que explicassem a patogenia do biofilme subgengival, e o modelo mais recentemente desenvolvido e aceite é o modelo PSD – sinergia microbiana e disbiose (do inglês *polymicrobial synergy and dysbiosis*). Este modelo implica que para se iniciar o desenvolvimento da periodontite é necessária a existência de uma comunidade microbiana sinérgica e disbiótica, ou seja, que ocorra uma alteração qualitativa/quantitativa dos componentes individuais da comunidade bacteriana (Abusleme et al., 2013; G Hajishengallis, Darveau, & Curtis, 2012; G. Hajishengallis & Lamont, 2012).

Para a disbiose acontecer, é essencial a presença de espécies que possuam a capacidade de, mesmo em concentrações muito baixas, modular a resposta do hospedeiro e comprometer as suas defesas, de forma a alterar o crescimento e desenvolvimento de toda a comunidade microbiana, desencadeando uma quebra da



homeostase e promoção da doença. Estas espécies são denominadas de “patógenos-chave”, e a *Porphyromonas gingivalis* está associada a este grupo, pelo que continua a ser um dos microrganismos mais importantes na patogénese da periodontite crónica. A *P. gingivalis* consegue, mesmo em baixos níveis de colonização (<0,01% da microbiota total), formar uma comunidade disbiótica, elevando a virulência de toda a comunidade através da comunicação interativa com patógenos acessórios e aumentando a carga bacteriana (Figura 3) (R P Darveau, Hajishengallis, & Curtis, 2012; G. Hajishengallis & Lamont, 2012; George Hajishengallis et al., 2011)

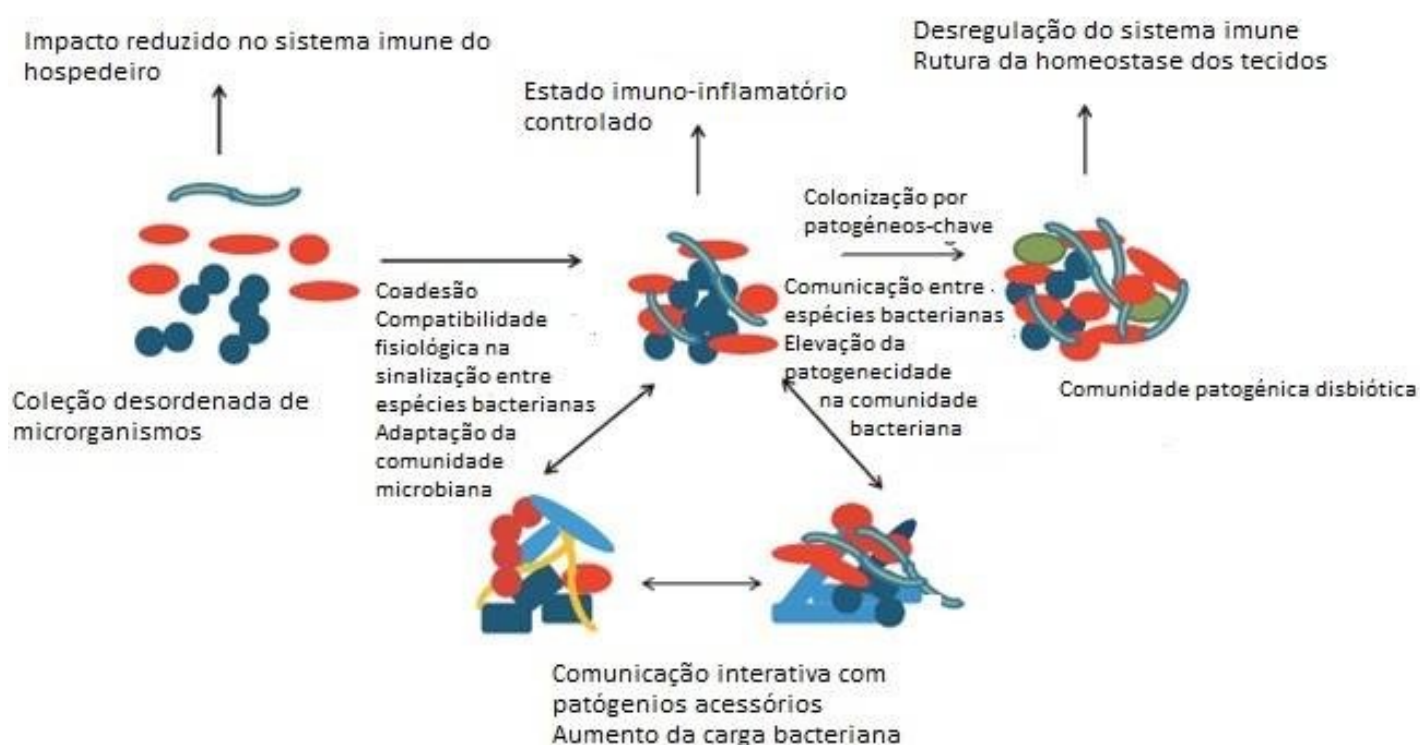


Figura 3 - Modelo da sinergia polimicrobiana e disbiose. Uma comunidade que inicialmente se encontrava em equilíbrio com o hospedeiro, sofre colonização por patógenos-chave. Estes, através da comunicação com patógenos acessórios, elevam a virulência da comunidade bacteriana, formando uma comunidade disbiótica. Isto traduz-se numa desregulação do sistema imune e rutura da homeostase dos tecidos. (Adaptado a partir de G. Hajishengallis & Lamont, 2012)

Quando a disbiose é estabelecida na comunidade microbiana, certos microrganismos tornam-se patogénicos, isto é, em condições de perturbação de homeostase têm o potencial de causar inflamação e destruição dos tecidos periodontais

(*pathobionts*). A inflamação e degradação tecidual, por sua vez, vão gerar produtos que constituem uma fonte de nutrientes para a comunidade, facilitando o crescimento da mesma (Figura 3) (Gaffen & Hajishengallis, 2008; Round & Mazmanian, 2009).

A flora microbiana subgengival, através da libertação de substâncias nocivas, contribui diretamente para a ocorrência de danos nos tecidos gengivais e periodontais (numa pequena proporção), no entanto o seu papel principal na patogénese da periodontite baseia-se na iniciação e manutenção de respostas imuno-inflamatórias, responsáveis pela maioria da degeneração tecidual (Garlet et al., 2006; Graves & Cochran, 2003; Newman et al., 2015).

Embora as bactérias periodontais sejam o fator inicial no desenvolvimento da PC, estes microrganismos tanto estão presentes em indivíduos com periodontite como em indivíduos com tecido periodontal saudável, apesar de nos primeiros estarem presentes em concentrações bastante mais elevadas, sugerindo que o biofilme dentário é necessário, mas não suficiente para induzir a periodontite. Isto levou a uma nova área de investigação, em que se verificou que não são apenas as bactérias que desempenham um papel crucial no desenvolvimento da doença, mas também a resposta imune do hospedeiro aos patógenos periodontais apresenta grande relevância no processo (Cortelli et al., 2008; G. Hajishengallis & Lamont, 2012; George Hajishengallis, 2014).

### **1.5.2. Resposta imune do hospedeiro**

O sistema imunológico tem um papel central e essencial para a manutenção da saúde periodontal, e a sua capacidade de resposta varia de indivíduo para indivíduo. Como tal, uma resposta imunitária desregulada ou inadequada, nomeadamente respostas hipo ou hiperinflamatórias, pode resultar no aumento da suscetibilidade individual à doença, desencadeando respostas inflamatórias crónicas prejudiciais, que conduzem ao desenvolvimento da patologia e apresentação precoce dos sinais clínicos da periodontite. (Lin et al., 2014; Newman et al., 2015). Enquanto num fenótipo hipoinflamatório a resposta do hospedeiro não é suficiente para combater o desafio bacteriano, num fenótipo hiperinflamatório, o mesmo desafio bacteriano provoca uma resposta inflamatória muito exacerbada, caracterizada pelo aumento da expressão de mediadores inflamatórios e grande infiltrado inflamatório celular (Kajiya et al., 2010; Newman et al., 2015).

A acumulação crónica de placa bacteriana, como descrito anteriormente, é considerado o agente de iniciação primário na etiologia da doença. No entanto, a

microbiota da placa por si só não é suficiente para começar ou fazer progredir a doença. O ataque inicial e persistente dos agentes patogénicos periodontais desenvolve uma resposta inflamatória, que por sua vez desencadeia uma resposta imunológica, sendo esta última a responsável pela grande maioria dos danos infligidos aos tecidos periodontais (Kajiya et al., 2010; Trombelli et al., 2004).

Em condições fisiológicas, uma alteração na flora bacteriana resulta numa libertação moderada de mediadores inflamatórios; cuja finalidade, em conjunto com as células imunitárias de defesa, é a eliminação das bactérias no sulco, mantendo a saúde periodontal. No entanto, em indivíduos portadores da doença, a resposta imunitária aos patogénios periodontais parece perder o controlo efetivo contra as bactérias desafio bacteriano e, em vez de possuir um papel protetor, como era suposto, tem antes um papel destruidor, sendo responsável pela degradação dos tecidos periodontais. A resposta imunológica pode ser alterada por modificações na microflora, por uma resposta do hospedeiro inadequada e/ou por mudanças ambientais (Figura 4) (Newman et al., 2015).

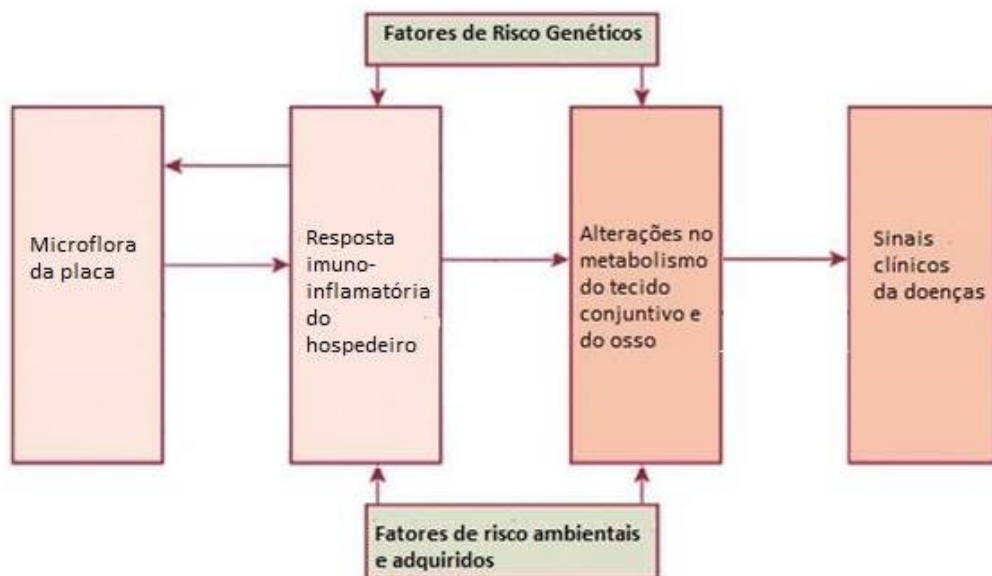


Figura 4 - Etiopatogênese da periodontite. A periodontite é desencadeada por uma complexa interação entre fatores, nomeadamente a microflora da placa, a resposta imuno-inflamatória do hospedeiro, fatores de risco genéticos e fatores de risco ambientais e adquiridos. A interação entre estes fatores irá desencadear alterações no metabolismo do tecido conjuntivo e do osso, resultando em sinais clínicos da doença. (Adaptado a partir de Newman et al., 2015)

## 2. Tecido Ósseo

Em condições fisiológicas, os processos de remodelação óssea encontram-se cuidadosamente regulados e controlados por fatores sistêmicos e locais, resultando assim num equilíbrio dinâmico entre formação e reabsorção óssea (Bruzzaniti & Baron, 2006; Teitelbaum, 2007).

O osso é um tecido conjuntivo especializado, dinâmico e ativo, que apresenta diversas funções, como suporte mecânico, proteção, homeostasia do cálcio no osso e na corrente sanguínea e hematopoiese. É formado por uma componente celular e outra extracelular, que corresponde à matriz óssea (Burr & Allen, 2014; Lindhe, 2008).

### 2.1. Osso alveolar

O osso alveolar, juntamente com o cemento, o ligamento periodontal e a gengiva, faz parte dos constituintes do periodonto, a estrutura que circunda e suporta os dentes (Di Benedetto, Gigante, Colucci, & Grano, 2013). O osso alveolar é um dos constituintes da maxila e da mandíbula e acompanha o desenvolvimento e erupção dos dentes, apoiando os alvéolos dentários. A sua principal função é a distribuição e absorção das forças geradas pelos contactos dentários, nomeadamente durante a mastigação (Lindhe, 2008).

Macroscopicamente, nas paredes dos alvéolos dentários o osso alveolar é constituído por osso cortical (denso, compacto), enquanto que a área entre os alvéolos é ocupada por osso trabecular (esponjoso) (Figura 5). O osso cortical é um osso mais forte, apresentando funções mecânica e protetora. O osso trabecular oferece resistência, atenuando as cargas oclusais e dirigindo as forças para o osso cortical. É também no osso trabecular que ocorre a maioria da remodelação óssea e das funções metabólicas do osso. (Feng & McDonald, 2011; Lindhe, 2008).

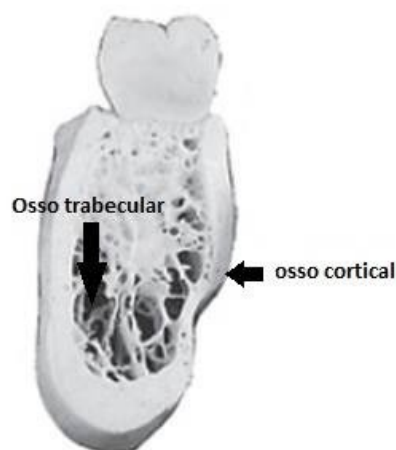


Figura 5 - Corte vertical de um molar, onde podemos observar o osso cortical (nas paredes dos alvéolos dentários) e o osso trabecular (área entre os alvéolos). (Adaptado a partir de J. L. Lindhe, 2008)

## **2.2. Componente extracelular**

A matriz óssea é composta principalmente por matéria orgânica e inorgânica, sendo que a primeira fornece resiliência e ductilidade e a segunda confere dureza. A composição mineral corresponde a aproximadamente 65%, sendo principalmente constituída por hidroxiapatite cristalina  $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]_3\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Dos 25% de componente orgânica, cerca de 90% correspondem a colagénio (principalmente tipo I, com pequenas quantidades de tipo III e V), e os restantes 10% são representados por proteínas não-colagenosas (PNC). Estas proteínas desempenham um papel fundamental na regulação da formação de colagénio e do tamanho de fibrilas, na mineralização, na adesão de células e na resistência a microfraturas. Por fim, os últimos 10% são compostos por água, sendo que uma parte está aprisionada no complexo colagénio-mineral e a outra parte encontra-se livre para fluir através de canais canaliculares e vasculares no osso. Estes últimos são de extrema importância, pois tem grande influência no comportamento mecânico do osso. Osso com uma percentagem de água menor irá ter uma percentagem de matéria inorgânica maior, o que, apesar de apresentar uma maior dureza, significa que tem tendência a ser mais frágil e, conseqüentemente, quebra mais facilmente (Burr & Allen, 2014; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

## **2.3. Componente celular**

### **2.3.1. Osteoblastos**

Os osteoblastos são as principais células envolvidas na formação óssea, responsáveis pela síntese de componentes orgânicos e controlo da mineralização da matriz óssea. São células derivadas de células estaminais mesenquimais, e encontram-se localizados nas superfícies ósseas (Burr & Allen, 2014; Kajiya et al., 2010).

Apesar da sua função primária ser a formação óssea, os osteoblastos também participam na regulação da reabsorção óssea, na medida em que produzem RANKL e OPG, duas proteínas que estão intimamente relacionadas com a atividade osteoclastogénica (Boyle, Simonet, & Lacey, 2003).

Os osteoblastos podem diferenciar-se em dois tipos diferentes de células: células de revestimento ósseo e osteócitos. Os primeiros são osteoblastos que, após completarem as suas funções, tornam-se achatados e alongados e cobrem a superfície óssea, sem qualquer atividade sintética (Burr & Allen, 2014; Lindhe, 2008). Os osteócitos são osteoblastos que ficaram aprisionados na matriz durante o processo de

formação óssea. São as células mais abundantes no osso (mais de 90%) e regulam a atividade de remodelação óssea local, ao coordenar a função dos osteoblastos e osteoclastos (Bonewald, 2007, 2011; Burr & Allen, 2014).

### **2.3.2. Osteoclastos**

Os osteoclastos são as principais células envolvidas na reabsorção óssea, com capacidade de degradar as matrizes orgânica e inorgânica do osso, sendo a sua ativação essencial para a ocorrência da perda óssea alveolar. São células grandes e multinucleadas derivadas de células estaminais hematopoiéticas, pertencentes à linhagem dos monócitos/macrófagos (Bar-Shavit, 2007; Bruzzaniti & Baron, 2006; Lerner, 2004; Lorenzo, Horowitz, Choi, Takayanagi, & Schett, 2015)

#### **2.3.2.1. Diferenciação osteoclástica**

A diferenciação das células estaminais hematopoiéticas em osteoclastos multinucleados funcionais envolve vários mecanismos moleculares e celulares complexos. No entanto, existem dois fatores que, sem os quais, a osteoclastogênese não seria possível: o fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) e o ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) – este último irá ser descrito em maior detalhe no capítulo 3.2. O primeiro atua principalmente na promoção da proliferação e sobrevivência dos precursores de osteoclastos e o segundo opera na condução da diferenciação dos precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros funcionais, bem como a ativação e sobrevivência dos mesmos (Lorenzo et al., 2015; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

Dentro da medula óssea, as células estaminais hematopoiéticas (HSC), através de fatores como o fator de células estaminais (SCF) e interleucinas 3 e 6 (IL-3 e IL-6), dão origem a células progenitoras mieloides comuns (CMP), que por sua vez se diferenciam em unidades formadoras de colônias de granulócitos/macrófagos (CFU-GM), por ação do fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (GM-CSF). Depois, pela estimulação do fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF), estas últimas diferenciam-se em unidades formadoras de colônias de macrófagos (CFU-M), que são consideradas as células progenitoras de osteoclastos (Figura 6) (Jules, Ashley, & Feng, 2010; Metcalf, 2008).

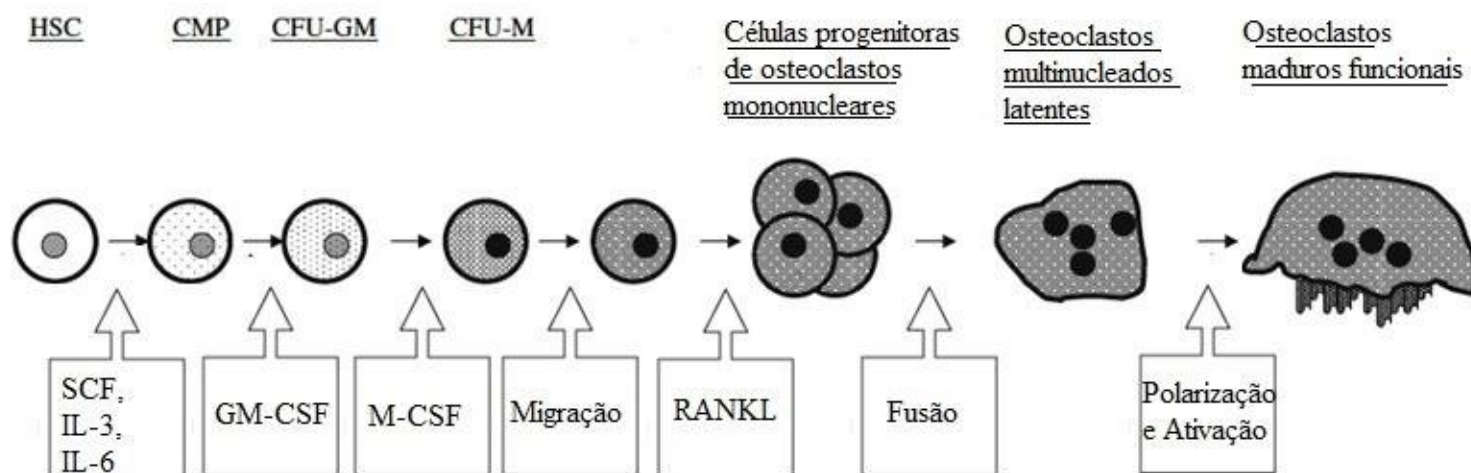


Figura 6 - Origem e formação osteoclástica. As HSC, pela ação do SCF, da IL-3 e IL-6 diferenciam-se em CMP, que por sua vez se diferenciam em CFU-GM, por ação do GM-CSF. Estas últimas diferenciam-se em CFU-M, na presença de M-CSF. Na superfície óssea, após a estimulação pelo RANKL, as CFU-M diferenciam-se em células progenitoras de osteoclastos mononucleares, que se fundem em osteoclastos multinucleados latentes. Por fim, estas células sofrem polarização com consequente ativação, dando origem a osteoclastos maduros funcionais (Adaptado a partir de Bronner, Farach-Carson, & Rubin, 2005).

As células progenitoras de osteoclastos, através de diversos mecanismos que não estão ainda inteiramente compreendidos e bem documentados, são recrutadas até à superfície do osso onde, através da ativação do recetor RANK (presente na superfície dos precursores osteoclásticos) pelo seu ligante RANKL, se diferenciam em células progenitoras de osteoclastos mononucleares. De seguida estas células fundem-se, levando à formação de osteoclastos multinucleados latentes (não ativados). Por fim, estes irão sofrer interações com a matriz óssea, que induzem polarização da membrana que se encontra adjacente ao osso, que resulta na formação de domínios funcionais especializados com consequente ativação em osteoclastos maduros funcionais, capazes de reabsorver matriz óssea (Burr & Allen, 2014; Lerner, 2004; F. Xu & Teitelbaum, 2013; Zou & Teitelbaum, 2010).

## 2.4. Remodelação óssea

Como já foi referido anteriormente, a remodelação óssea normal é um processo em que a formação e reabsorção óssea estão intimamente acoplados, de modo a garantir que não haja alterações na quantidade/qualidade da massa óssea. Neste processo, o osso

antigo é degradado pelos osteoclastos e substituído por osso novo pelos osteoblastos (Feng & McDonald, 2011; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

A remodelação óssea é realizada por uma estrutura funcional e anatômica denominada unidade básica multicelular (BMU) e pode ser dividida em quatro fases (Figura 7):

- Fase 1: início da remodelação óssea através do recrutamento de precursores de osteoclastos;
- Fase 2: período predominante de reabsorção óssea e diferenciação de osteoclastos, juntamente com o recrutamento de células estaminais mesenquimais (MSC) e osteoprogenitores;
- Fase 3: período predominante de formação óssea e diferenciação de osteoblastos e síntese osteoide;
- Fase 4: mineralização do osteoide e conclusão da remodelação óssea (Feng & McDonald, 2011; Martin & Seeman, 2007)



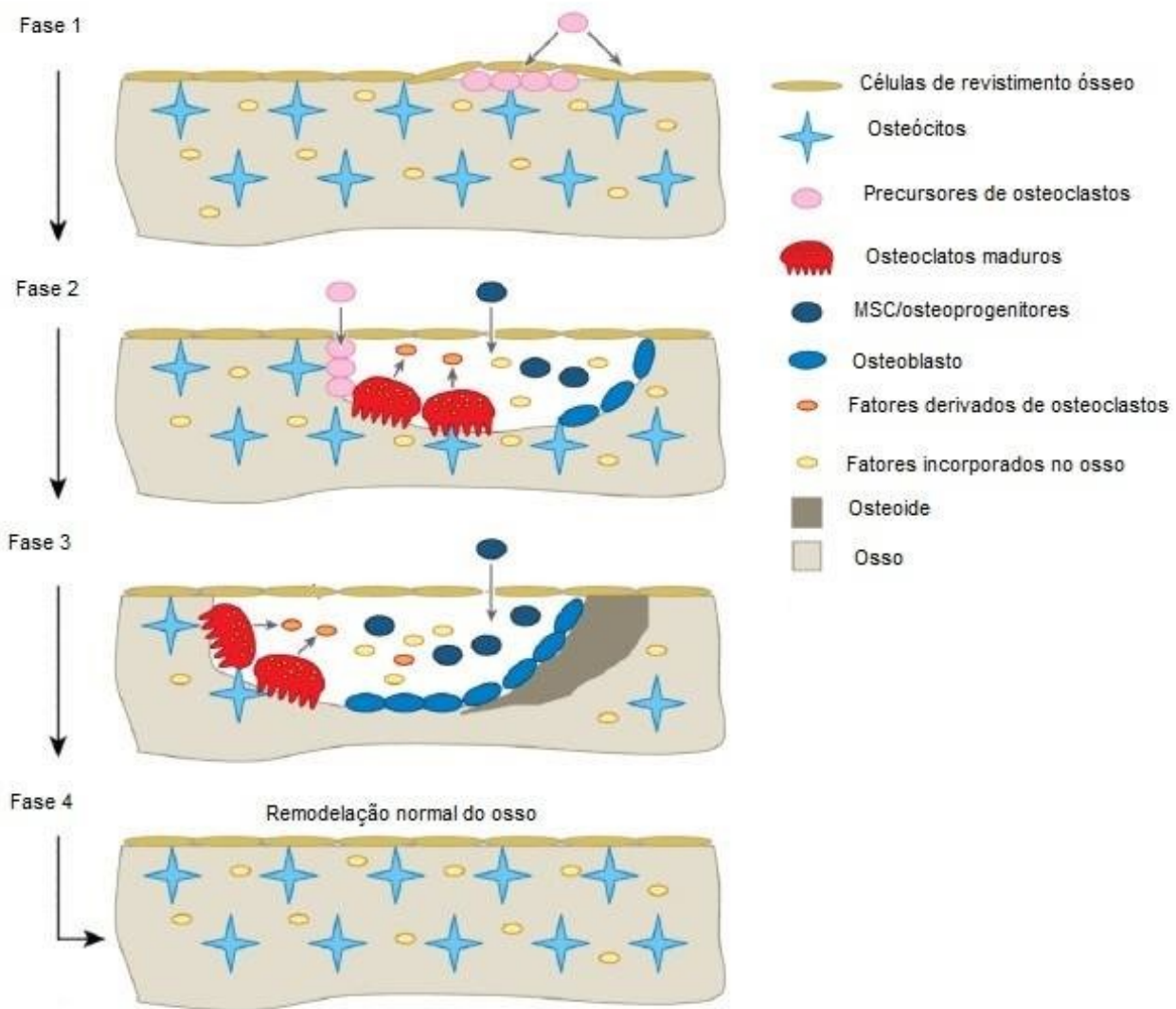


Figura 7 - Quatro fases da remodelação óssea. A primeira fase corresponde ao início da remodelação óssea, na segunda predomina a reabsorção óssea, a terceira corresponde à formação óssea e, por fim, temos a remodelação óssea completa. (Adaptado a partir de Feng & McDonald, 2011)

## 2.5. Reabsorção óssea

Quando o equilíbrio nos processos de remodelação óssea é comprometido, vai instalar-se uma situação de patologia, havendo um aumento da formação ou reabsorção óssea. No caso da periodontite crônica, estamos presentes uma excessiva reabsorção óssea (Feng & McDonald, 2011; Raggatt & Partridge, 2010).

Para ocorrer reabsorção óssea é necessária a formação de domínios funcionais especializados no osteoclasto e no osso, que envolvem três estruturas essenciais: uma zona de selagem, uma superfície irregular, denominada borda pregueada (*ruffled*

*border*) e um compartimento de reabsorção óssea extracelular – lacuna de Howship (Figura 7). A primeira encontra-se na interface osso-osteoclasto, é responsável pela expressão da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , essencial na adesão dos osteoclastos à matriz óssea. É também esta zona que limita e leva à formação do compartimento de reabsorção óssea e circunscreve a borda pregueada. A formação da última é estimulada pela tirosina quinase c-Src, e permite o transporte de prótons e enzimas hidrolíticas para dentro do compartimento de reabsorção que, respetivamente, dissolvem minerais e degradam proteínas da matriz óssea, e facilita ainda a internalização de produtos da matriz óssea degradada (Burr & Allen, 2014; Feng & McDonald, 2011; Lerner, 2004; F. Xu & Teitelbaum, 2013; Zou & Teitelbaum, 2010).

A reabsorção óssea propriamente dita envolve dois processos, começando pela dissolução da matriz inorgânica seguida de clivagem proteolítica da matriz orgânica. A primeira etapa é iniciada pelo bombeamento de prótons para a lacuna de Howship – onde é criado um microambiente com um pH cerca de 4,5 – através de bombas  $H^+$ -adenosina trifosfatase do tipo vacuolar ( $V-H^+ATPase$ ), abundantemente presentes na borda pragueada. A fonte dos prótons ( $H^+$ ) citoplasmáticos resulta da dissociação do ácido carbónico ( $H_2CO_3$ ) em  $H^+$  e bicarbonato ( $HCO_3^-$ ). O ácido carbónico forma-se a partir da reação entre o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) e a água ( $H_2O$ ), catalisada pela anidrase carbónica II (CAII) citoplasmática. (Figura 8). Também presente na borda pragueada, de modo a recuperar a eletroneutralidade da secreção ácida, estão presentes canais de cálcio de carga acoplada à  $V-H^+ATPase$  (especificamente o CIC-7), que transportam cloreto ( $Cl^-$ ) para a lacuna de Howship. O bombeamento destes prótons é acompanhado pela troca de bicarbonato (saída) com o cloreto (entrada) no osteoclasto, por um permutador cloreto-bicarbonato (Figura 8) (Feng & McDonald, 2011; Hienz et al., 2015; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

A degradação da componente orgânica da matriz óssea é realizada pela enzima proteolítica lisossómica catépsina K e por metaloproteinases de matriz (MMPs). Primeiro os produtos degradados sofrem endocitose, sendo de seguida transportados ao longo de uma via de transcitose vesicular – onde são destruídos pela enzima TRAP (fosfatase ácida resistente ao tartarato) – até serem libertados para fora dos osteoclastos no lado de anti-reabsorção da célula (Figura 8) (Burr & Allen, 2014; Hienz et al., 2015; F. Xu & Teitelbaum, 2013)

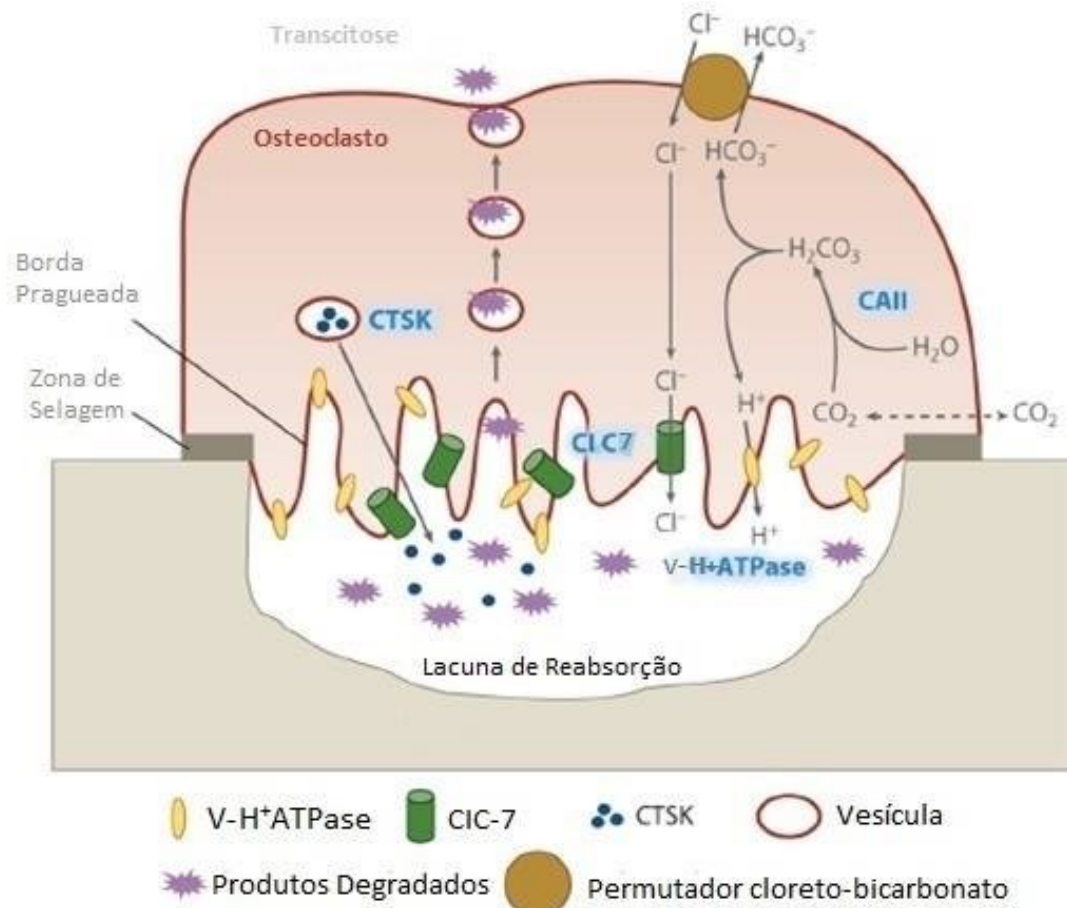


Figura 8 - Domínios funcionais e mecanismos de reabsorção óssea no osteoclasto. Para ocorrer reabsorção óssea, temos de ter presentes domínios funcionais, nomeadamente a borda pregueada, a zona de selagem e a lacuna de reabsorção. A reabsorção óssea é iniciada pelo transporte de  $H^+$  para a lacuna de reabsorção através da  $V-H^+ATPase$ . O  $H^+$  resulta da dissociação do  $H_2CO_3$  – formado pela reação entre o  $CO_2$  e  $H_2O$  através da  $CAII$  – em  $H^+$  e  $HCO_3^-$ . Através de um permutador cloreto-bicarbonato, o  $HCO_3^-$  sai e o  $Cl^-$  entra no osteoclasto, e é transportado pelos  $CIC-7$  para a lacuna de reabsorção. A componente orgânica é degradada pela catepsina K ( $CTSK$ ), e os produtos degradados são expulsos dos osteoclastos por uma via de transcitose vesicular. (Adaptado a partir de Feng & McDonald, 2011).

São os domínios funcionais especializados que permitem a adesão e migração dos osteoclastos ao longo da superfície óssea, acidificando e degradando a matriz óssea mineralizada. Após a reabsorção óssea estar completa, os osteoclastos entram em apoptose (morte celular programada) (Burr & Allen, 2014).

### 2.5.1. Reabsorção óssea na periodontite

A periodontite crônica é caracterizada pela destruição do ligamento periodontal e reabsorção do osso alveolar, sendo esta última considerada a principal marca da doença (Richard P Darveau, 2010; Vernal et al., 2006).

A perda óssea alveolar pode ser entendida como um mecanismo de proteção do organismo, pois conforme a frente inflamatória se vai aproximando do osso alveolar, a reabsorção óssea é iniciada, de modo a evitar a invasão bacteriana no osso (Figura 9) (Cochran, 2008). O osso alveolar é reabsorvido de forma a que esteja sempre presente uma largura de cerca de 0,5 a 1,0 mm de tecido conjuntivo não-infiltrado a recobrir o osso, e a reabsorção óssea cessa quando existe uma distância mínima de 2,5 mm entre as bactérias da bolsa periodontal e o osso alveolar (Newman et al., 2015). Deste modo, à medida que a frente inflamatória avança, os mediadores pró-inflamatórios, como o RANKL, estimulam os osteoclastos para reabsorverem o osso. Isto resulta num “recuo” protetor do osso face à frente inflamatória, no entanto, também conduz à presença de mobilidade dentária e, se o processo não for travado, irá finalmente levar à perda de dentes (Kajiya et al., 2010; Newman et al., 2015).

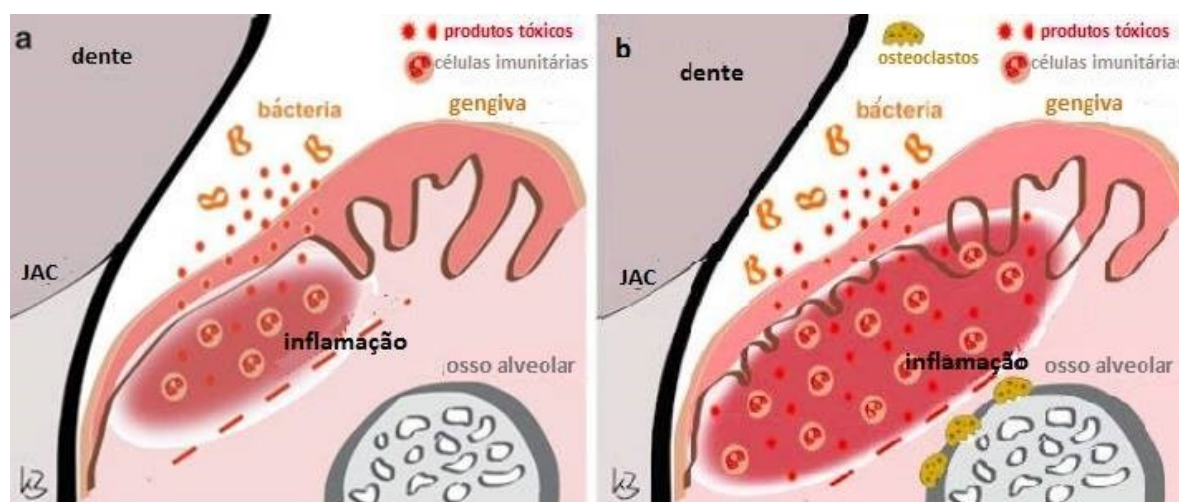


Figura 9 - Relação espacial entre a frente inflamatória e a reabsorção óssea alveolar. Quando a frente inflamatória se encontra longe do osso (a), não há estimulação da osteoclastogênese, no entanto quando a frente inflamatória se encontra perto do osso (b), ocorre estimulação da osteoclastogênese com consequente reabsorção óssea alveolar. (Adaptado a partir de Pietschmann, 2012)

### **3. Sistema RANKL/RANK/OPG**

O sistema RANKL/RANK/OPG é um dos sistemas mais importantes na promoção da reabsorção óssea, e a sua regulação está intimamente ligada à diferenciação e ativação dos osteoclastos (Lerner, 2004; F. Xu & Teitelbaum, 2013). Visto que, como já foi referido anteriormente, a reabsorção óssea é a característica principal da periodontite, é expectável que este sistema apresente uma grande importância no desenvolvimento da doença, pelo que iremos dar especial atenção a este tema neste capítulo.

#### **3.1. Recetor ativador do fator nuclear kappa B**

O recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) é uma proteína transmembranar tipo I, membro da superfamília de recetores do fator de necrose tumoral (TNF). Foi pela primeira vez identificado por Anderson (1997), através da análise de genes expressos nas células dendríticas. Dois anos mais tarde, foi demonstrado ser o recetor para o RANKL nos osteoclastos (Hsu et al., 1999).

O gene de RANK encontra-se presente no cromossoma humano 18 – mais especificamente no *locus* 18q22.1 – e o RANK é expresso maioritariamente pelas células progenitoras de osteoclastos, osteoclastos, linfócitos B e T e células dendríticas (Anderson et al., 1997; Hsu et al., 1999; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

Esta proteína é constituída por 616 aminoácidos (aa), um péptido de sinal (28 aa), um domínio extracelular N-terminal com quatro sequências de resíduos de aminoácidos pseudo-repetidas ricas em cisteína (184 aa), um domínio transmembranar (21 aa) e uma cadeia citoplasmática C-terminal (383 aa) que se estende no citoplasma. Como o RANK não possui atividade enzimática intrínseca no seu domínio intracelular, tem que ser ativado através da interação com o RANKL para que ocorram as transduções de sinal a jusante do RANK, que resultam na formação de osteoclastos funcionais (Figura 9) (Bilezikian et al., 2008; Lerner, 2004).

Dougall (1999), conduziu um ensaio experimental em ratos, durante o qual eliminou o gene do RANK, tornando-os deficientes em RANK. Isto levou a que os ratos exibissem um fenótipo osteopetrótico, apresentando ausência completa de osteoclastos multinucleados e de nódulos linfáticos periféricos, demonstrando assim que o RANK tem um papel crucial na osteoclastogénese e no desenvolvimento imunológico. Também (Li (2000), num estudo similar, mostrou que, apesar dos ratos apresentarem um fenótipo osteopetrótico, devido à ausência de osteoclastos, este podia ser recuperado com um

transplante de medula óssea, o que sugere que os defeitos são intrínsecos de células hematopoiéticas (as quais fazem parte da linhagem osteoclástica), suportando a teoria que o RANK já estará presente nas células progenitoras de osteoclastos.

### **3.2. Ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B**

O ligante do recetor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), também conhecido como membro 11 da superfamília de ligantes do fator de necrose tumoral (TNFSF-11), citocina indutora de ativação relacionada com o TNF (TRANCE), fator de diferenciação de osteoclastos (ODF) e ligante osteoprotegerina (OPGL), é uma proteína transmembranar tipo II, que pertence à superfamília dos ligantes do fator de necrose tumoral, tendo sido descoberta por vários grupos independentes no fim dos anos 90 (Anderson et al., 1997; Lacey et al., 1998; Wong, 1997; Yasuda et al., 1998). Esta proteína desempenha um papel fundamental na regulação da diferenciação dos osteoclastos e é indispensável para a ocorrência de osteoclastogénese (Hienz et al., 2015; Lorenzo et al., 2015; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

O RANKL é produzido no osso trabecular, na medula óssea, na placa epifisária, no perióstio, no baço, no timo e nos nódulos linfáticos. A um nível celular, apresenta uma elevada expressão nas células estromais da medula óssea, nos osteoblastos, nos osteócitos, nos fibroblastos e nas células B e T ativadas; sendo que a sua expressão nas últimas é especialmente acentuada no tecido gengival de indivíduos portadores de periodontite. O RANKL tanto pode ser expresso na forma de proteínas ancoradas à membrana (mRANKL) ou clivada numa forma solúvel (sRANKL), sendo ambas funcionalmente ativas (Bruzaniti & Baron, 2006; Kawai et al., 2006; Lerner, 2004; Vernal et al., 2006).

O gene do RANKL encontra-se presente no cromossoma humano 13, mais especificamente no *locus* 13q14. O RANKL é constituído por 316 aminoácidos, um domínio extracelular de ligação ao recetor (248 aa), uma região citoplasmática (47 aa), e uma região transmembranar (21 aa) (Anderson et al., 1997). Esta molécula tem forma de sino invertido, e a sua base interage com os recetores num complexo simétrico 3:3, e contém quatro laços únicos responsáveis pela especificidade na interação com o RANK (Lerner, 2004).

À semelhança do que aconteceu com o ensaio experimental em ratos com deficiência em RANK, também o estudo realizado por Kong (1999), no qual os ratos sofreram deleção do gene do RANKL e, por conseguinte, deficiência em RANKL,



apresentaram ausência completa de osteoclastos multinucleados, exibindo uma forma severa de osteopetrose, além da ausência de nódulos linfáticos periféricos; demonstrando, como no estudo executado por Dougall (1999), que o RANKL é um fator imprescindível para a formação de osteoclastos e para o desenvolvimento imunológico. No entanto, ao contrário do estudo anterior, o fenótipo osteopetrótico não pode ser restaurado com transplante de medula óssea, o que sugere que a ausência de osteoclastos não é devido a células hematopoiéticas deficientes, o que suporta a teoria do RANKL não ser expresso por células da linhagem osteoclástica.

### 3.3. Osteoprotegerina

A osteoprotegerina (OPG) foi inicialmente descoberta por Tsuda (1997), como fator inibidor de osteoclastos (OCIF). Esta molécula, tal como o RANK, é membro da superfamília de recetores do TNF, e apresenta uma sequência homóloga ao RANK, pelo que apresenta uma elevada afinidade para o RANKL, ligando-se competitivamente ao RANKL impedindo a sua ligação ao RANK. Isto faz com que não ocorra ativação do RANK nem interações RANK/RANKL, o que resulta na inibição da diferenciação osteoclástica (Figura 10) (Hienz et al., 2015; Lerner, 2004; Lorenzo et al., 2015).

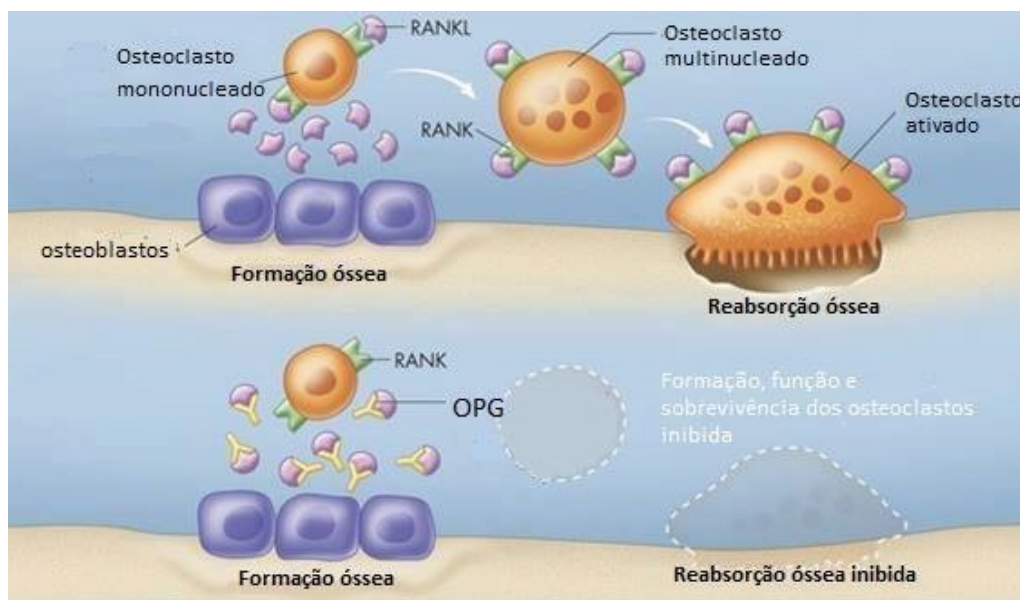


Figura 10 - Interação RANK/RANKL (em cima) vs interação OPG/RANKL (em baixo). Quando a concentração da OPG está baixa/ausente, o RANKL liga-se ao RANK, que provoca a formação de osteoclastos ativados e promoção da reabsorção óssea. Pelo contrário, quando a concentração da OPG está alta, esta liga-se ao RANKL, impedindo a sua ligação ao RANK, o que resulta na inibição da formação, função e sobrevivência dos osteoclastos, com consequente inibição da reabsorção óssea. (Adaptado a partir de <https://www.healthplexus.net/article/bone-biology-and-role-rankrankl-opg-pathway>)

A OPG é expressa por células estromais, por osteoblastos, por osteócitos e por fibroblastos, e o gene da OPG encontra-se localizado no cromossoma humano 8 (*locus* 8q23-24). A OPG é sintetizada como uma proteína de 401 aminoácidos, e depois da clivagem de um péptido de sinal de (21 aa), torna-se numa proteína madura de 380 aa. Apresenta quatro domínios ricos em cisteína na extremidade N-terminal, dois "domínios de morte" homólogos (DDH) na extremidade C-terminal, um local de ligação para heparina e um resíduo de cisteína necessário para a homodimerização, no entanto não apresenta domínio transmembranar nem se estende para o citoplasma, razão pela qual não tem capacidade de sinalização direta (Burr & Allen, 2014; Jaedicke, Preshaw, & Taylor, 2016; Lerner, 2004).

### **3.4. Vias ativadas pelo o sistema RANKL/RANK/OPG**

A ativação do RANK através da sua interação com o RANKL vai conduzir à ativação de várias vias de transdução de sinal cuja finalidade é a promoção da osteoclastogénese, resultando num quadro clínico de reabsorção óssea (F. Xu & Teitelbaum, 2013).

#### **3.4.1. Fator associado ao recetor TNF 6**

A ativação do RANK resulta no recrutamento de fatores associados ao recetor TNF (TRAFs), que se ligam ao domínio intracelular do RANK, na sua cadeia C-terminal citoplasmática. Esta cadeia possui três motivos de ligação TRAF funcionais – PFQEP<sup>369-373</sup> (motivo 1), PVQEET<sup>560-565</sup> (motivo 2) e PVQEQG<sup>604-609</sup> (motivo 3) – que desencadeiam a ativação de seis vias de sinalização principais na regulação da formação, função e/ou sobrevivência osteoclástica – NF- $\kappa$ B, JNK, ERK, p38, NFATc1 e Akt (Figura 11) (Bilezikian et al., 2008; Boyle et al., 2003; F. Xu & Teitelbaum, 2013).



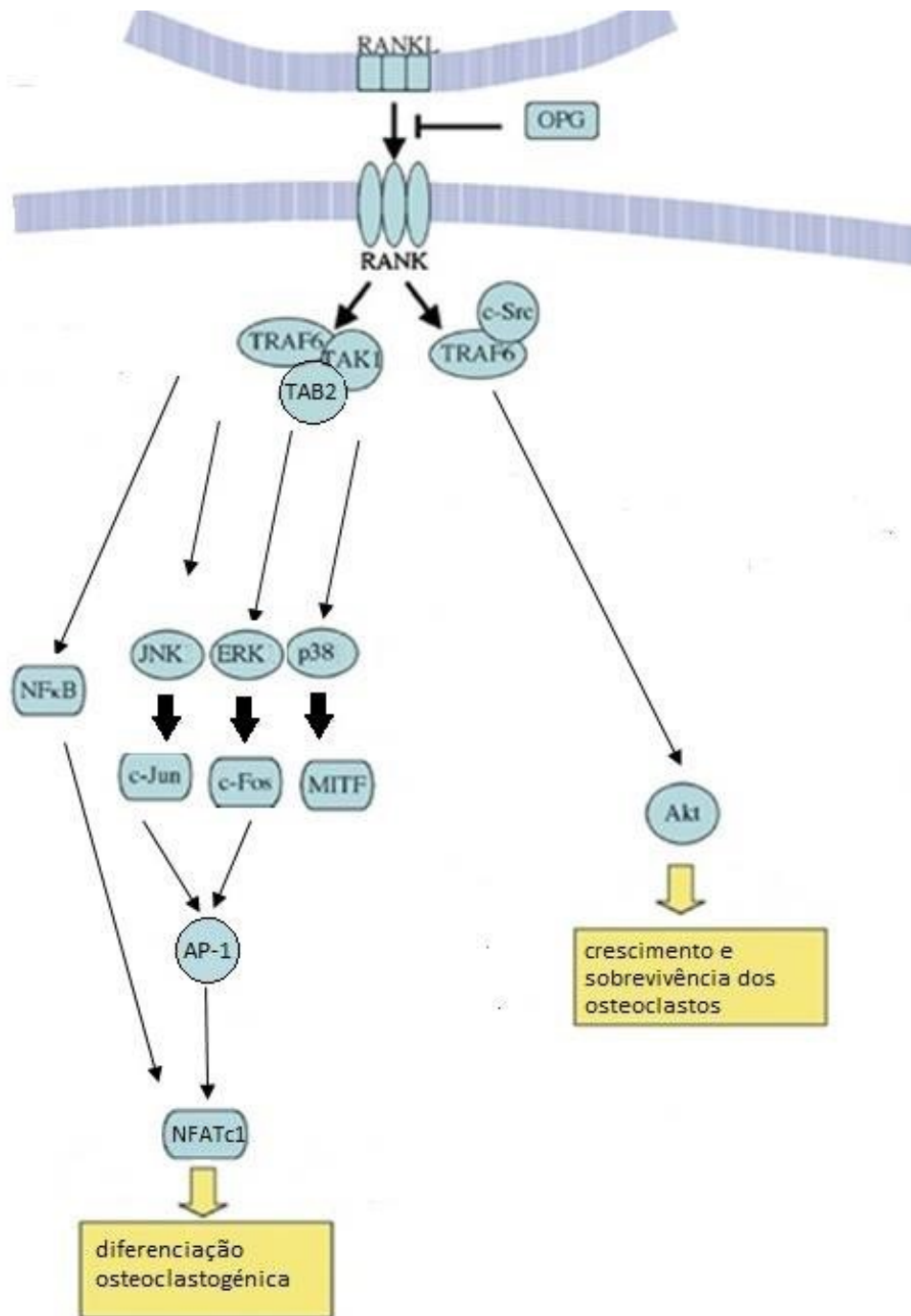


Figura 11- Transduções de sinal a jusante da interação RANK/RANKL. Após a ligação RANK/RANKL, o TRAF6, juntamente com a TAK1 e a TAB2 vai conduzir à ativação de JNK, ERK, p38 e NF-κB. ERK e JNK induzem e ativam c-Fos e c-Jun, respectivamente, levando à estimulação da AP-1, e p38 induz e ativa o MITF. O NF-κB, juntamente com a AP-1, conduzem à estimulação do NFATc, essencial para a diferenciação osteoclastogênica. Outra via de transdução do sinal é iniciada pela interação TRAF6/c-src, resultando no recrutamento da Akt, fundamental para crescimento e sobrevivência dos osteoclastos.

(Adaptado a partir de Aeschlimann & Evans, 2004)

A família de proteínas adaptadoras TRAF contém sete membros (TRAF 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7) mas apenas cinco (TRAF 1, 2, 3, 5 e 6) interagem com o RANK. Os mecanismos pelos quais os motivos 2 e 3 ativam a osteoclastogênese ainda não são totalmente claros, no entanto, a atividade do motivo 1 encontra-se bem documentada e sabe-se que este interage com o TRAF6, que é a principal molécula adaptadora que relaciona o RANK à osteoclastogênese (Bilezikian et al., 2008; Kim & Kim, 2016)

### **3.4.2. Quinases ativadas por mitogénios**

A ligação do TRAF6 ao RANK forma um complexo de sinalização constituído pela quinase ativada por TGF- $\beta$  1 (TAK1) e pela proteína 2 de ligação a TAK1 (TAB2), que conduzem à ativação do NF- $\kappa$ B e três quinases ativadas por mitogénios (MAPKs) – quinase regulada por sinal extracelular (ERK), quinase N-terminal Jun (JNK) e p38 (Figura 11) (Bilezikian et al., 2008).

As vias de transdução de sinal do ERK e do JNK incluem a ativação do fator de transcrição proteína ativadora-1 (AP-1), um complexo dimérico composto por proteínas Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2), Jun (c-Jun, JunB, JunD) e ATF (ATFa, ATF2, ATF3, ATF4, B- ATF). O ERK induz e ativa o c-Fos e o JNK fosforila o c-Jun, levando a um aumento da atividade da AP-1, resultando na estimulação do NFATc1. Já o p38 leva à induz e ativação do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF). (Figura 11) (Bilezikian et al., 2008; Choi, 2010).

### **3.4.3. Fator nuclear kappa B**

O fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) é um dos mais importantes fatores de transcrição para a osteoclastogênese, e a sua ativação é induzida por RANK e mediada por TRAF6. O NF- $\kappa$ B é constituído por uma família de fatores de transcrição diméricos composta por cinco membros – c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- $\kappa$ B 1 (p50) e NF- $\kappa$ B 2 (p52) – no entanto apenas p50 e p52 apresentam papéis indispensáveis na formação osteoclástica (Bilezikian et al., 2008; Kim & Kim, 2016; Lerner, 2004).

No seu estado inativo, o NF- $\kappa$ B encontra-se acoplado à proteína inibidora de  $\kappa$ B (I $\kappa$ B) no citoplasma. Após a ativação do RANK, o TRAF6 fosforila a I $\kappa$ B quinase (IKK), ativando-a, o que desencadeia a ubiquitinação e degradação da I $\kappa$ B, que resulta na dissociação do complexo I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B. De seguida, ocorre a translocação de

subunidades do NF- $\kappa$ B para o núcleo e inicia-se a transcrição de genes específicos de osteoclastos (Figura 12) (Kim & Kim, 2016; Lerner, 2004; J. Xu et al., 2009).

A ativação do NF- $\kappa$ B contribui para a estimulação do NFATc1 de duas formas: a primeira por recrutamento da molécula e ligação direta ao promotor do NFATc1, e a segunda indiretamente através da estimulação de c-Fos, que induz a expressão do NFATc1 (Bilezikian et al., 2008).

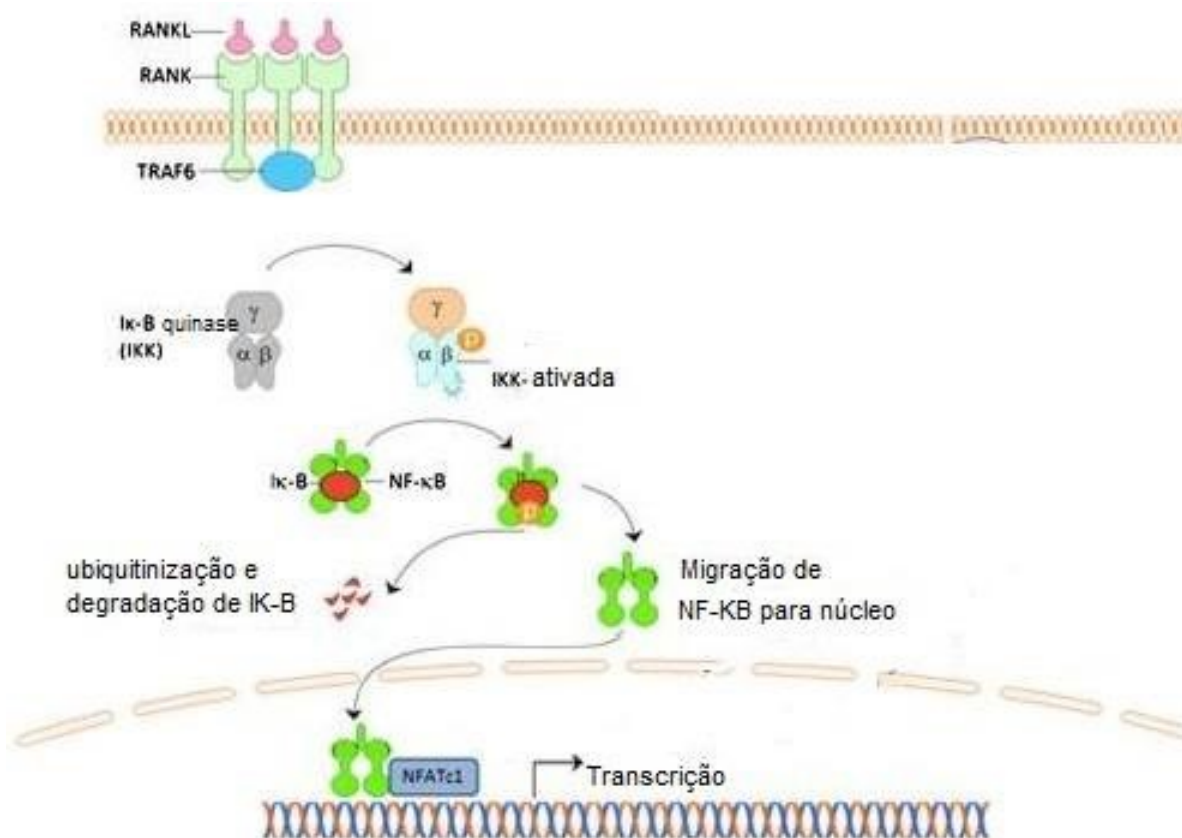


Figura 12 - Transdução do sinal do NF- $\kappa$ B. O TRAF6 fosforila e ativa a I $\kappa$ B quinase (IKK) que, por sua vez, provoca a ubiquitinação e degradação da I $\kappa$ B, acoplada ao NF- $\kappa$ B. Deste modo, ocorre dissociação do complexo I $\kappa$ B/NF- $\kappa$ B, com translocação de subunidades do NF- $\kappa$ B para o núcleo. No núcleo inicia-se a transcrição de genes específicos de osteoclastos, como o NFATc1. (Adaptado a partir de Kular et al., 2012)

#### 3.4.4. Fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1

A família dos fatores nucleares de células T ativadas (NFAT) são fatores de transcrição originalmente identificados nas células T. É composta por cinco membros, contudo o fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 1 (NFATc1), também

conhecido como o fator nuclear de células T ativadas 2 (NFAT2) é o mais fortemente induzido por RANKL, e é considerado o fator de transcrição principal na regulação da diferenciação osteoclástica (Bilezikian et al., 2008; Choi, 2010). A importância do NFATc1 para a osteoclastogênese foi demonstrada num estudo conduzido por Aliprantis (2008), em que observou *in vivo* que a deleção do NFATc1 em ratos resultava em que não ocorresse diferenciação de osteoclastos, resultando em quadros de osteopetrose.

Para além do NF- $\kappa$ B e da AP-1 (já referido anteriormente), também outro membro da família dos fatores de transcrição NFAT – o fator nuclear de células T ativadas citoplasmático 2 (NFATc2) – é recrutado e liga-se ao promotor do NFATc1, com consequente ativação e indução do NFATc1, correspondendo esta à estimulação inicial deste fator nuclear. De seguida, através da mediação pela calcineurina, uma fosfatase específica estimulada pela via cálcio/calmodulina, o NFATc1 é ativado e liga-se ao seu próprio promotor, resultando numa grande expressão da molécula – autoamplificação (Figura 13) (Bilezikian et al., 2008; Kim & Kim, 2016).

Por fim, ocorre a formação de um complexo transcricional constituído por NFATc1 por AP-1, por PU.1, por MITF e pela proteína de ligação ao elemento de resposta do AMP cíclico (CREB) que induzem a ativação de genes específicos cruciais para a diferenciação e função osteoclástica, como o TRAP, o recetor associado aos osteoclastos (OSCAR), a catepsina K e o recetor da calcitonina (Figura 13) (Bilezikian et al., 2008; Choi, 2010; Okamoto & Takayanagi, 2011).

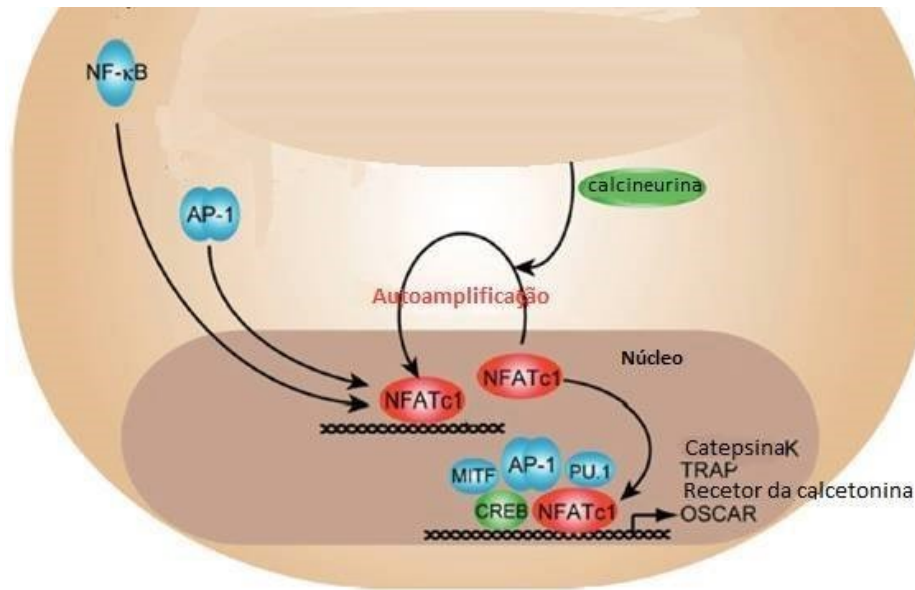


Figura 13 - Transdução do sinal do NFATc1. Além do NF-κB e da AP-1, também o próprio NFATc1, através da ativação pela calcineurina, estimula o NFATc1 – autoamplificação. De seguida, ocorre a formação de um complexo constituído por NFATc1, AP-1, PU.1, MITF e CREB, que induzem a ativação da catepsina K, do TRAP, do recetor da calcitonina e do OSCAR, genes cruciais para a diferenciação e função osteoclástica. (Adaptado a partir de Okamoto & Takayanagi, 2011)

### 3.4.5. Proteína quinase B

A interação do TRAF6 com a tirosina quinase c-Src (estimulada pelo M-CSF) vai levar à ativação da PI3K (fosfatidilinositol 3 quinase), que leva à produção de PIP3 (fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfato), que por sua vez recruta a Akt (proteína quinase B). A sobrevivência da sinalização da Akt tem extrema importância na atividade anti-apoptótica dos osteoclastos, na medida em que a Akt tem a capacidade de fosforilar a proteína pró-apoptótica Bad (promotor de morte associado ao Bcl-2) deixando-a inativa. Deste modo, fica assim inibida a sua atividade apoptótica, resultando na sobrevivência dos osteoclastos (Figura 14) (Kim & Kim, 2016; Lerner, 2004).

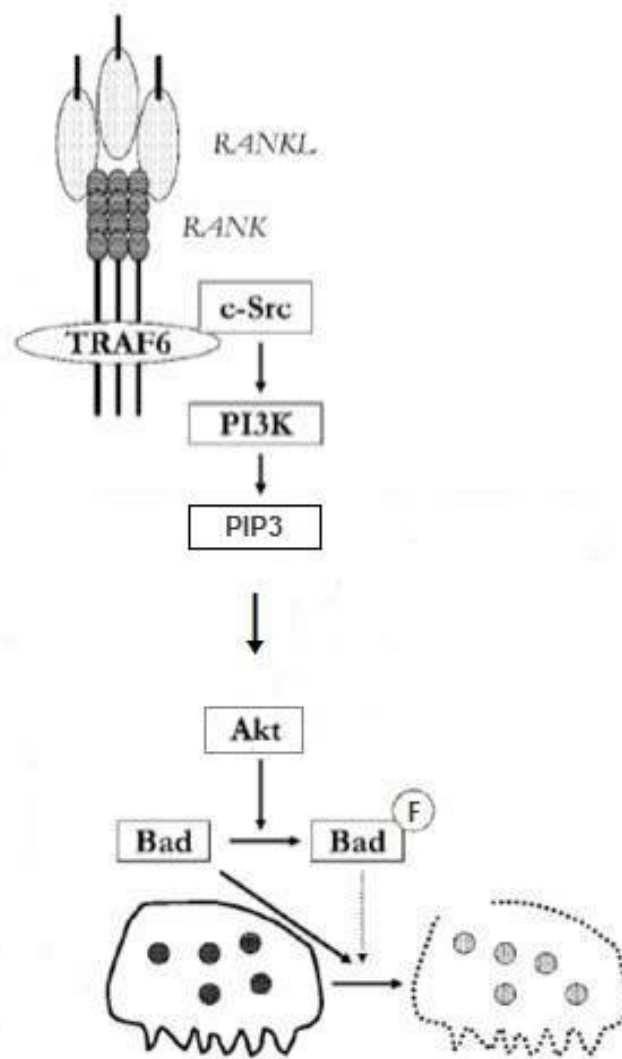


Figura 14 - Transdução de sinal da Akt. A interação TRAF6/c-Src leva à ativação de PI3K, que por sua vez estimula PIP3, levando ao recrutamento da Akt. A Akt possui a capacidade de fosforilar o Bad, inibindo assim a apoptose dos osteoclastos. (Adaptado a partir de Lerner, 2004)

### 3.5. Fatores que influenciam a expressão de RANKL

#### 3.5.1. Mediadores inflamatórios

Para ocorrer reabsorção óssea em resposta à reação inflamatória, existem dois fatores essenciais que têm de ser respeitados: em primeiro lugar, é necessário que a concentração de mediadores inflamatórios seja suficiente para ativar as vias que conduzem à reabsorção óssea e, em segundo, que esses mesmos mediadores penetrem no tecido gengival a uma distância crítica ao osso alveolar (Cochran, 2008; Graves & Cochran, 2003).

A produção de mediadores pró-inflamatórios é regulada por uma grande variedade de células, hormonas, citocinas e patógenos bacterianos. São vários os mediadores que favorecem a osteoclastogénese, seja pelo aumento da proliferação de osteoclastos, pela sua formação e ativação ou pela recruta de mensageiros essenciais à osteoclastogénese, como o RANKL (Hienz et al., 2015; F. Xu & Teitelbaum, 2013).

A estimulação da expressão do RANKL pode ser feita através de uma grande variedade de mediadores inflamatórios, como a IL-1, IL-6, IL-7, IL-11, IL-17, o TNF- $\alpha$ , o LIF (fator inibidor de leucemia), a oncostatina M (OSM) e a bradicinina. Além destes mediadores inflamatórios, também outros mediadores aumentam a produção de RANKL, nomeadamente a hormona paratiroideia (PTH), a 1,25-di-hidroxi-vitamina D3, a forskolina, trombina e muitos outros (Cochran, 2008; Hajishengallis, 2014; Hienz et al., 2015; Lerner, 2004; Newman et al., 2015).

Também existem mediadores que diminuem os níveis de RANKL e, deste modo, inibem a osteoclastogénese, tais como a calcitonina, interferão gama (IFN- $\gamma$ ), fator de transformação de crescimento beta (TGF- $\beta$ ), IL-10, IL-13, entre outros (George Hajishengallis, 2014; Hienz et al., 2015; J. Lin et al., 2014).

Apesar de não existir um consenso geral entre autores, acredita-se que são três as citocinas pró-inflamatórias mais relevantes na estimulação da reabsorção óssea osteoclástica mediada por RANKL na periodontite – IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  (Antonini et al., 2013; Hienz et al., 2015).

#### **3.5.1.1. Interleucina 1 beta, interleucina 6 e fator de necrose tumoral alfa**

A interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ) foi a primeira citocina pró-inflamatória cuja presença foi associada aos tecidos gengivais de indivíduos com periodontite (Jaedicke et al., 2016). Esta citocina possui uma grande variedade de funções, desde o recrutamento e ativação de neutrófilos e células T e B até à estimulação dos precursores de osteoclastos e da reabsorção óssea, através do aumento da expressão do RANKL e supressão da OPG pelas células estromais (Chen et al., 2014; Lindhe, 2008; Taylor, 2014).

A IL-6 tem um papel importante na regulação, desenvolvimento, proliferação e atividade das células B e T, dos monócitos, das células mielóides e dos osteoclastos (que se diferenciam a partir das duas anteriores) (Bartold & Narayanan, 2006; Preshaw & Taylor, 2011; Rincon, 2012). A ação primária da IL-6 é a estimulação direta da

expressão de efetores produzidos por osteoblastos e pelas células estromais, que por sua vez participam na ativação de osteoclastos, como é o caso do RANKL. Isto vai resultar na modulação do sistema RANKL/RANK/OPG, com consequente aumento da reabsorção óssea (Lu, Chen, Chang, Li, & Kuo, 2006). A IL-6 também é secretada em resposta à atividade da IL-1 $\beta$  e do TNF- $\alpha$  (Antonini et al., 2013).

O fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) estimula a osteoclastogênese de diferentes formas: através do aumento da expressão do RANKL nas células gengivais epiteliais e pela ativação de c-Jun e do NF- $\kappa$ B, conhecidas vias de transdução de sinal ativadas pelo RANKL. Na presença do RANKL, o TNF- $\alpha$  sinergiza a proliferação e diferenciação osteoclástica (Fujihara et al., 2013; Yamilina, Xu, Chen, & Ivashkiv, 2011). Esta citocina também partilha muitas atividades biológicas semelhantes às da IL-1 $\beta$  (Antonini et al., 2013).

### **3.5.2. Infiltrado inflamatório celular**

Como referido anteriormente, a ocorrência de uma resposta inflamatória é caracterizada pelo aumento da expressão de mediadores inflamatórios e grande presença de infiltrado inflamatório celular. Na periodontite, esta resposta vai gerar um infiltrado inflamatório de macrófagos, neutrófilos (resposta inata imunológica) e células B e T (células da resposta adaptativa imunológica) no tecido conjuntivo gengival. (Di Benedetto et al., 2013; George Hajishengallis, 2014; Yucel-Lindberg & Båge, 2013).

#### **3.5.2.1. Neutrófilos**

Um dos muitos eventos provocados pela patogénese da periodontite é a elevada acumulação de neutrófilos (também conhecidos como leucócitos polimorfonucleares – PMN's) especialmente em bolsas periodontais (Figura 15). Os PMN's, além da sua função fagocitária, induzem a reabsorção óssea osteoclastogénica através da expressão do mRANKL (mas não do sRANKL), o que implica que para ocorrer esta estimulação os PMN's têm que estar em proximidade do osso alveolar (Chakravarti, Raquil, Tessier, & Poubelle, 2009).

#### **3.5.2.2. Células T e B**

Com o auxílio da microscopia confocal de dupla cor, Kawai e colaboradores (Kawai et al, 2006) conduziu um estudo para identificar quais os tipos de células que expressavam RANKL em tecidos gengivais inflamados. Os resultados obtidos



mostraram que, ao contrário do que acontecia em tecidos gengivais saudáveis (em que o infiltrado inflamatória de células B e T eram menos de 20%), em tecidos gengivais com PC, as células T (45%) e B (50%) eram as mais predominantes, provando que em padrões clínicos de doença, há um recrutamento das células T e B para os tecidos gengivais. Também foi demonstrado uma correlação positiva entre a percentagem de células T e B e o aumento da profundidade das bolsas periodontais. Das células B e T encontradas, mais de 50% das T e 90% das B expressaram RANKL, sugerindo que estas são a maior fonte da molécula (Kajiya et al., 2010).

No entanto, num estudo realizado por Vernal e colaboradores (Vernal et al., 2006), foi demonstrado que os linfócitos T  $CD4^+$  (52,4%) são as células mais predominantes em tecidos gengivais inflamados, seguidas pelos linfócitos T  $CD8^+$  (19,3%) e linfócitos B (sem dados), e que os linfócitos T  $CD4^+$  são as principais células responsáveis pela expressão de RANKL em quadros clínicos de periodontite.

Apesar da existência de alguma discordância entre autores, os estudos sugerem que as células T e B são as mais predominantes nos tecidos gengivais durante quadros de periodontite, e as principais responsáveis pela expressão do RANKL. Estas células tanto têm um efeito indireto, ao induzir a secreção de citocinas pró-inflamatórias que irão conduzir à expressão do RANKL, como também possuem um efeito direto, ao aumentar a produção do RANKL (Figura 15) (Berglundh, Donati, & Zitzmann, 2007; Gemmell, Yamazaki, & Seymour, 2007; Kajiya et al., 2010; Vernal et al., 2006). As células B e T medeiam a reabsorção óssea através da expressão do sRANKL, no entanto a expressão do mRANKL é limitada. A expressão do sRANKL também se encontra bastante elevada nos tecidos gengivais com doença em relação aos saudáveis, e também se verifica uma correlação positiva com o aumento da profundidade das bolsas periodontais (Hienz et al., 2015; Kawai et al., 2006).

As células T  $CD4$  auxiliares imaturas ( $Th0$ ), ao interagir com células apresentadoras de antígenos, diferenciam-se em diferentes subtipos de células T, dependendo das citocinas por elas produzidas. Estes subtipos incluem as células T auxiliares tipo 1, 2 e 17 ( $Th1/Th2/Th17$ ) e T reguladoras (Treg), e definem respostas imunes distintas. Estas células são responsáveis pelo controlo dos mecanismos mediados pelas respostas imunes, incluindo a sobre-regulação e sub-regulação da osteoclastogénese, no entanto a sua função ainda não está totalmente esclarecida e há alguma discordância entre autores, de modo que é um tema que gera ainda alguma controvérsia (Hienz et al., 2015; X. Lin, Han, Kawai, & Taubman, 2011; Tobón-

Arroyave, Isaza-Guzmán, Restrepo-Cadavid, Zapata-Molina, & Martínez-Pabón, 2012; Yucel-Lindberg & Båge, 2013).

De acordo com alguns investigadores, as células Th1 induzem a reabsorção óssea através da expressão do RANKL e da produção da IL-1 e do TNF- $\alpha$  (que por sua vez também irão contribuir para o aumento do RANKL), demonstrando o efeito destrutivo destas células (Gaffen & Hajishengallis, 2008; Garlet, 2010; Han, Kawai, & Taubman, 2007; Hernández et al., 2011). Por outro lado, outros grupos de investigação afirmam que as Th1 têm um papel protetivo na reabsorção óssea, e que apenas predominam em lesões periodontais estáveis, quando existe um equilíbrio entre o hospedeiro e o biofilme dentário; enquanto as células Th2 conduzem ao desenvolvimento de lesões destrutivas associadas com a progressão da periodontite, ao estimular um filtrado inflamatório rico em células B e contribuir para a sua ativação (Gemmell et al., 2007; Newman et al., 2015; Ohlrich et al., 2009).

As flutuações da reabsorção óssea na periodontite estão bem documentadas, e uma possível explicação para este fenómeno consiste na interação dinâmica entre as células Th1 e Th2. Mais recentemente, foi demonstrado que a interação destas células só por si não explicam a totalidade dos mecanismos descritos, pelo que foram atribuídos novos papéis a outras células, como Th17 e Treg (Newman et al., 2015; Ohlrich et al., 2009).

Relativamente às células Th17, pensa-se que estimulam a osteoclastogénese, devido à produção da IL-17, que apresenta uma ação pró-inflamatória (Hienz et al., 2015; Newman et al., 2015; Yucel-Lindberg & Båge, 2013). No entanto, existem autores que defendem que esta também tem um papel protetor (Taubman & Kawai, 2001). As Treg, por sua vez, apresentam um papel protetivo, ao prevenir a inflamação excessiva e suprimir a reabsorção óssea mediada pelas Th1, Th2 e Th17, e também pela produção da IL-10 e do TGF- $\beta$ , conhecidas citocinas anti-inflamatórias (George Hajishengallis, 2014; Han et al., 2007).

Com base na informação descrita anteriormente, podemos afirmar que é difícil atribuir funções definitivas aos diferentes subtipos das células T, sendo de extrema importância a continuação da investigação para melhor elucidar estes mecanismos (George Hajishengallis, 2014; Newman et al., 2015).

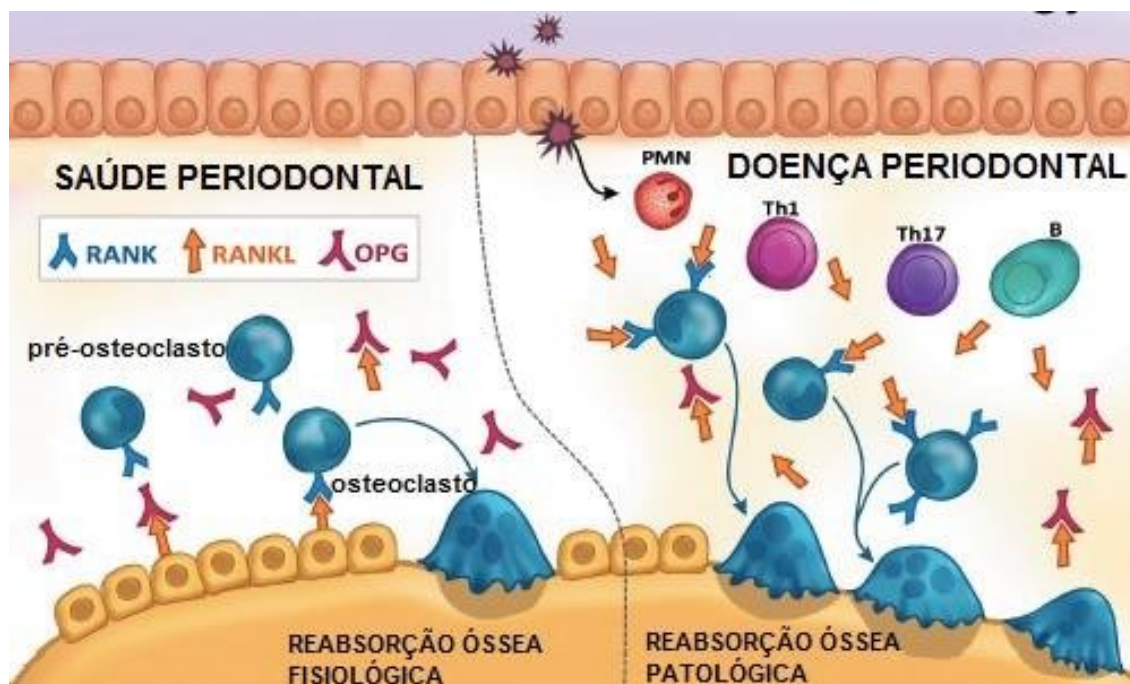


Figura 15 - Saúde periodontal (esquerda) vs. doença periodontal (direita). Na saúde periodontal estamos perante um quadro de reabsorção óssea fisiológica, enquanto na doença periodontal há um recrutamento acentuado de PMN's e células B e T em resposta à inflamação periodontal. Isto resulta num aumento do RANKL, desencadeando um quadro de reabsorção óssea patológica. (Adaptado a partir de Silva et al., 2015)

### 3.5.3. Biofilme subgengival e fatores de virulência microbial

Como já foi referido anteriormente, um fator permissivo para o desenvolvimento da periodontite são as bactérias periodontais, e estas contêm várias estruturas denominadas padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) – incluindo lipopolissacarídeos (LPS), peptidoglicanos, DNA e RNA bacteriano e lipoproteínas – considerados fatores de virulência microbial, que desencadeiam a reação inflamatória e ativação do sistema imune (Di Benedetto et al., 2013; J. Lin et al., 2014).

#### 3.5.3.1. Lipopolissacarídeos

Os LPS são considerados um dos fatores de virulência microbial mais importantes na periodontite; encontram-se na membrana exterior de bactérias gram-negativas (como a *Porphyromonas gingivalis*) e atuam como endotoxinas. Os LPS são reconhecidos pelo sistema inato imune através de *toll-like receptors* (TLRs), e a sua

interação desencadeia uma grande diversidade de eventos intracelulares que resulta no recrutamento de leucócitos para os tecidos periodontais por quimiotaxia, no aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios pelas células imunitárias e na ativação de osteoclastos (Di Benedetto et al., 2013; Hienz et al., 2015; Newman et al., 2015).

O LPS de *Porphyromonas gingivalis* (patógeno-chave para o desenvolvimento da periodontite) é reconhecido pelos TLR-2 e TLR-4, expressos em pré-osteoclastos, cimentoblastos e células do ligamento periodontal (Kajiya et al., 2010; J. Lin et al., 2014; Newman et al., 2015). A interação LPS-TLR estimula a osteoclastogênese mediada por RANKL através vários mecanismos, sejam estes indiretos – por intermédio da ativação e regulação de respostas das células T CD4<sup>+</sup>, principalmente pelo TLR-4, e pelo aumento da expressão osteoblástica de mediadores pró-inflamatórios como a IL-1 $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e a PGE<sub>2</sub>; ou diretos – através da produção de esfingolípido que promovem a expressão de RANKL pelos osteoblastos através de TLR-2 e pela estimulação de transdutores de sinal a jusante da interação RANK-RANKL, como o TRAF6, o NF- $\kappa$ B e as MAPKs (Liu, Cao, Huizinga, Hafler, & Toes, 2014; Udagawa et al., 2007; Y. H. Wang et al., 2010).

De modo a comprovar isto, Vernal (2006) conduziu um estudo em que comparou os níveis de concentração de RANKL em grupos de linfócitos estimulados com LPS e grupos de linfócitos não estimulados, ambos em pacientes com periodontite. O primeiro grupo apresentou valores significativamente estatísticos mais altos que o segundo grupo, levando à conclusão de que os LPS aumentam a estimulação do RANKL e, conseqüentemente, aumentam a reabsorção óssea.

### 3.6. Rácio RANKL/OPG na periodontite

A ativação e formação dos osteoclastos está intimamente relacionada com a regulação do sistema RANKL/RANK/OPG, e é a expressão destas moléculas que irá determinar o número de osteoclastos formados e, conseqüentemente, se iremos estar perante um quadro de reabsorção óssea ou de inibição da mesma (Lerner, 2004).

Quando a concentração de RANKL em torno dos pré-osteoclastos é superior em relação à de OPG, o RANKL torna-se disponível para se ligar ao RANK expresso nos precursores osteoclásticos, conduzindo à sobrevivência e ativação osteoclástica, com conseqüente aumento da reabsorção óssea. Pelo contrário, quando a concentração de OPG está aumentada em relação à de RANKL, a OPG vai ligar-se ao RANKL, impedindo assim a sua ligação ao RANK, com conseqüente redução da velocidade e

intensidade da osteoclastogênese e promoção da apoptose de osteoclastos previamente diferenciados e ativados, resultando na inibição da reabsorção óssea (Figura 16) (Boyle et al., 2003; Burr & Allen, 2014; Kajiya et al., 2010)

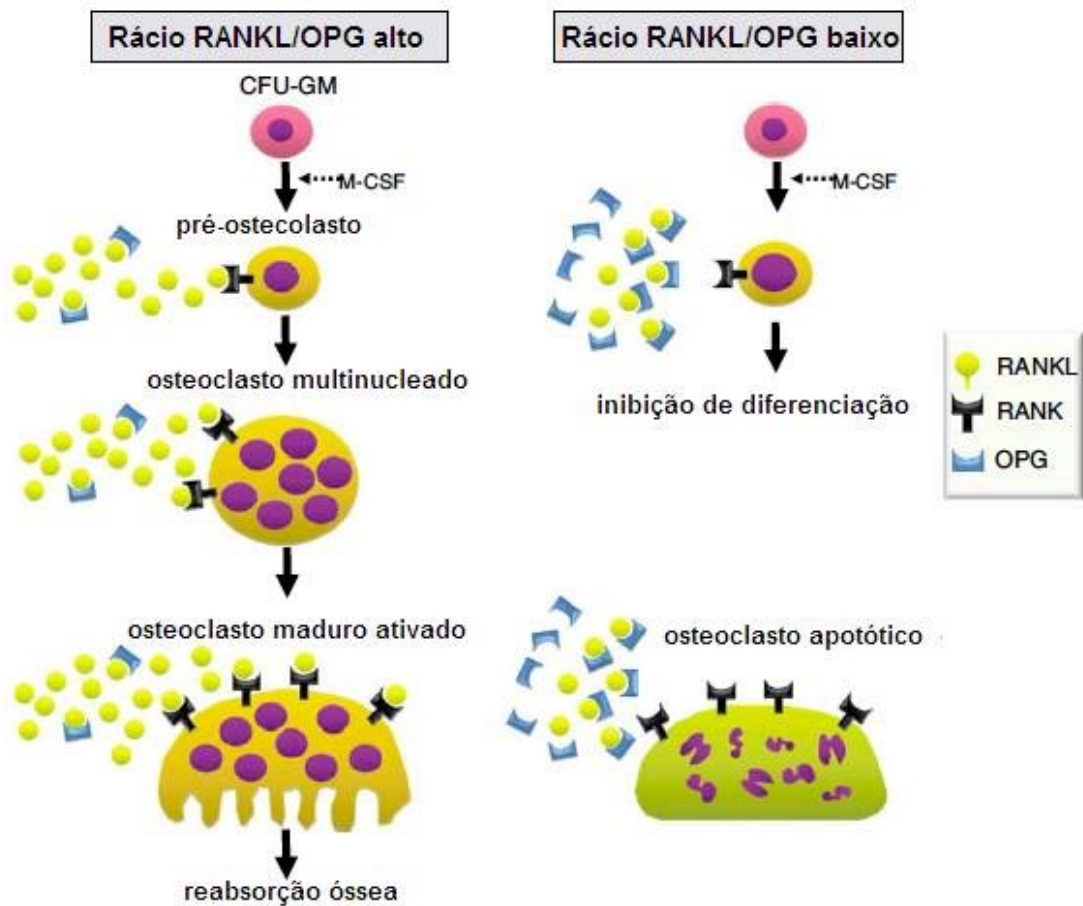


Figura 16 - Diferenças no rácio RANKL/OPG e consequente influência na osteoclastogênese. Quando o rácio RANKL/OPG está alto, o RANKL vai ligar-se ao RANK, o que conduz à formação de osteoclastos ativos maduros e, consequentemente, a promoção da reabsorção óssea (esquerda). Pelo contrário, se o rácio RANKL/OPG está baixo, a OPG liga-se ao RANKL, que resulta na inibição da diferenciação de osteoclastos e na apoptose dos mesmos (Adaptado a partir de Kajiya et al., 2010).

Os exames clínico e radiológico periodontais são os procedimentos de eleição para o diagnóstico da periodontite, no entanto, por vezes estes métodos não são suficientes para determinar a atividade da doença ou a suscetibilidade do paciente à progressão da doença. A análise de biomarcadores presentes nos fluidos orais fornece informações complementares aos métodos convencionais, sendo aconselhada a combinação de dois ou mais biomarcadores para a facultação de dados mais rigorosos.

Apesar disso, é de focar que os exames clínico e radiológico periodontais são imprescindíveis e não podem ser substituídos por outro meio de diagnóstico periodontal (Lu et al., 2006; Sarlati, Sattari, Razzaghi, & Nasiri, 2012).

Tanto a saliva como o FCG são considerados bons fluidos de diagnóstico, e ambos apresentam vantagens e desvantagens. Os dois são métodos menos invasivos que as biopsias gengivais, ainda assim, comparando com o FCG, a recolha de saliva é um processo bastante mais simples, pois além da sua recolha ser mais acessível (está presente num volume bastante maior), é ligeiramente menos invasiva e não há necessidade de habilidades específicas do operador e instalações clínicas próprias para a colheita. Apesar disso, a técnica de recolha de saliva é considerada uma técnica menos precisa que a do FCG, devido à presença de resíduos orais (Buduneli & Kinane, 2011; Jaedicke et al., 2016).

Outro aspeto é que, enquanto o FCG reflete processos inflamatórios em sítios individuais da doença, a saliva é considerada como um espelho da saúde oral e sistémica, o que pode apresentar uma maior relevância em termos clínicos. No entanto, a especificidade do local da amostra do FCG também pode ser considerada uma vantagem (Buduneli & Kinane, 2011; Jaedicke et al., 2016).

A descoberta da influência do rácio RANKL/OPG na osteoclastogénese levou à realização de vários estudos de modo a analisar o padrão de expressão de RANKL e de OPG em quadros de periodontite.

Estudos efetuados por Bostanci (Bostanci et al., 2007), Lu (Lu et al., 2006) e Tobón-Arroyave (Tobón-Arroyave et al., 2012) demonstraram que os níveis de RANKL estavam significativamente mais elevados nos indivíduos com periodontite crónica, comparativamente aos grupos de saúde periodontal. Também foi observado que a concentração de OPG se encontrava mais reduzida nos grupos com periodontite crónica relativamente aos grupos de controlo (Bostanci et al., 2007; Sarlati et al., 2012; Tobón-Arroyave et al., 2012). No entanto apenas nos trabalhos de Bostanci e Tobón-Arroyave (Bostanci et al., 2007; Tobón-Arroyave et al., 2012) foram encontrados valores estaticamente significativos.

Pelo contrário, nos estudos produzidos por Lu (Lu et al., 2006) e Sarlati (Sarlati et al., 2012), os níveis de RANKL e de OPG não mostraram diferenças significativas entre os grupos de saúde periodontal e de periodontite crónica, nem nos grupos de diferentes severidades na doença, sugerindo que não há uma correlação positiva

entre a concentração destas moléculas e a severidade da doença. Salienta-se que Lu não conseguiu detetar concentrações de OPG significativas em nenhum dos grupos.

Dos estudos que analisaram o rácio RANKL/OPG (Bostanci et al., 2007; Sarlati et al., 2012; Tabari et al., 2013), todos mostraram valores mais altos nos grupos de periodontite comparativamente aos de saúde periodontal, no entanto, apenas nos trabalhos de Bostanci e Tabari os valores foram estaticamente significativos.

Esta incoerência entre resultados pode ser devida a variados fatores, desde fatores relacionados com os estudos, como diferenças nos procedimentos de recolha de amostra, na metodologia de análise usada, descalibrações ou diferenças de sensibilidade ou especificidade dos imunoensaios por ELISA (ensaio imuno-enzimático) como também fatores relacionados com os indivíduos em estudo, como diferenças na gravidade, progressão e atividade da doença (Lu et al., 2006; Sarlati et al., 2012; Tobón-Arroyave et al., 2012).

Apesar de alguma discordância entre autores, estudos efetuados no FCG (Bostanci et al., 2007; Lu et al., 2006) e na saliva (Tobón-Arroyave et al., 2012) encontraram evidências em relação ao aumento dos níveis de RANKL (biomarcador patogénico) e na diminuição dos de OPG (biomarcador protetivo ou protetor) em quadros clínicos de periodontite crónica, como seria expectável. Contudo, a análise individual das concentrações de RANKL e de OPG podem não oferecer dados adequados sobre o estado da doença, pelo que se sugere que a análise destes biomarcadores seja com base na sua proporção relativa (Bostanci et al., 2007; Tabari et al., 2013).

Uma limitação destes estudos é que, sendo estudos transversais, não se consegue determinar a atividade da periodontite, pelo que a realização de novos estudos transversais pode fornecer novas informações relevantes sobre a doença (Tabari et al., 2013).

### **3.7. Terapêuticas farmacológicas com o sistema RANKL/RANK/OPG como alvo**

O tratamento convencional para a periodontite consiste na remoção mecânica do biofilme subgengival, com subsequente redução da flora bacteriana, o que desencadeia a resolução da inflamação gengival, resultando no controlo da doença. Apesar da sua eficácia, esta abordagem requer manutenção periódica e elevada cooperação do paciente (Di Benedetto et al., 2013; Pietschmann, 2012).

Como já foi referido anteriormente, a resposta imunológica do hospedeiro tem um papel muito significativo na patogénese da periodontite, sendo esta a responsável pela maioria dos danos infligidos aos tecidos periodontais. Um dos efeitos desta resposta imunológica é a estimulação e ativação do sistema RANKL/RANK/OPG, que resulta na promoção da reabsorção óssea. Estas observações conduziram à pesquisa de novas estratégias terapêuticas baseadas na modulação imunológica, que ao interferir na interação RANK-RANKL podem constituir a base destas novas terapias, resultando na prevenção da reabsorção óssea e perda dentária em indivíduos com periodontite (Cochran, 2008; Di Benedetto et al., 2013; X. Lin et al., 2011; Miller, 2009).

Denosumab, também conhecido como AMG 162, é o primeiro anticorpo monoclonal anti-RANKL para uso humano, um novo agente que inibe a formação osteoclástica através da sua ligação a RANKL. Deste modo, RANKL fica indisponível para se ligar ao RANK, impedindo assim a sua ativação e da consequentemente cascata de sinalização a jusante do RANK, resultando na diminuição da reabsorção óssea (Figura 17) (Miller, 2009).

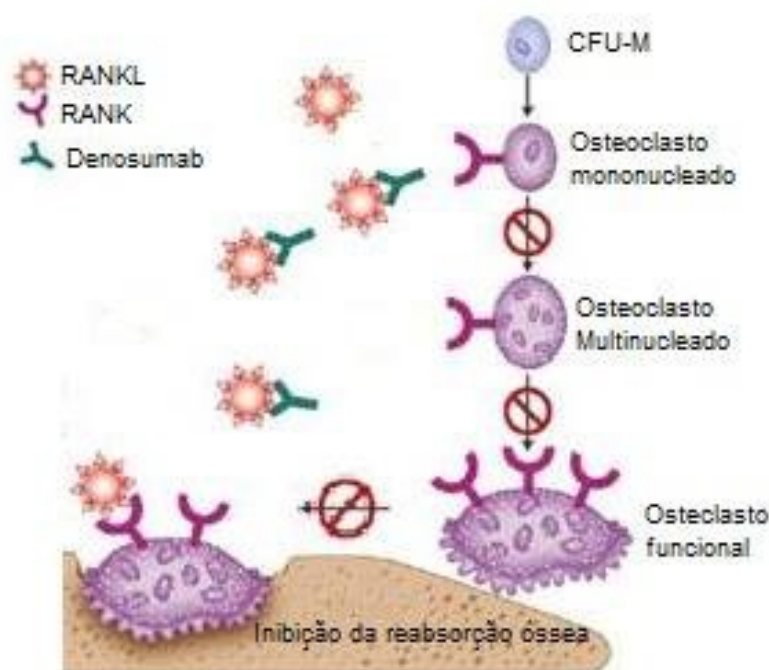


Figura 17 - Mecanismo de ação do anticorpo anti-RANKL Denosumab. O Denosumab liga-se ao RANKL, impedindo a sua interação com o RANK, o que vai conduzir à inibição da formação de osteoclastos funcionais e, consequentemente, à inibição da reabsorção óssea. (Adaptado a partir de Miller, 2009)



Ensaio clínico com o uso de Denosumab como tratamento têm sido realizados em mulheres na pós-menopausa com osteoporose, em que se verificou uma rápida diminuição da reabsorção óssea, com consequente aumento da densidade óssea, sugerindo que este tratamento possa ser eficaz para estes indivíduos. O Denosumab não fica retido no tecido ósseo, pelo que quando o seu uso é descontinuado, a duração do seu efeito é rápida e reversível, o que desencadeia uma redução na densidade óssea (Lewiecki et al., 2007; Miller, 2009).

Apesar do evidente sucesso do tratamento, estes ensaios clínicos ainda são recentes, pelo que tem que ser avaliado se a sua aplicação sistémica de longa duração traz potenciais efeitos secundários. Além disso, ainda está por determinar se este tratamento será efetivo para outras doenças de reabsorção óssea além da osteoporose, pois esta é uma terapêutica a nível sistémico enquanto a periodontite é uma doença localizada, de modo que seria mais favorável um tratamento limitado à sua localização (X. Lin et al., 2011; Pietschmann, 2012).

X. Lin (2011) conduziu um estudo em que avaliaram a redução da reabsorção óssea com recurso a tratamento com anticorpos anti-RANKL num modelo de osteoclastogénese *in vitro* e num modelo de doença periodontal em ratos *in vivo*, com recurso a um sistema de reabsorção óssea imuno-mediado especificamente por células T.

*In vitro* verificou-se que anticorpos anti-RANKL provocam uma inibição da osteoclastogénese nas células osteoclásticas numa forma dependente da dose. *In vivo*, tanto a concentração de sRANKL nos tecidos gengivais como a reabsorção óssea alveolar mostraram redução significativa nos grupos de ratos injetados com anticorpos anti-RANKL comparativamente aos grupos controlo. Ainda se verificou uma correlação positiva entre os dois grupos e também se concluiu que a expressão de RANKL por células T é diretamente inibida pelos anticorpos anti-RANKL (X. Lin et al., 2011).

Apesar destes resultados apresentarem uma grande taxa de sucesso, ainda não é fidedigno afirmar que esta intervenção terapêutica é segura para indivíduos com quadros clínicos de periodontite, pois os dados recolhidos estão restritos a estudos experimentais com animais. Contudo, é pertinente continuar a investigação e realização de ensaios clínicos nesta área, pois estes podem constituir o futuro da terapia periodontal (Cochran, 2008; Pietschmann, 2012).

### **III. CONCLUSÃO**

A doença periodontal é uma das doenças mais prevalentes na população mundial, e a periodontite crónica é uma das doenças orais com maior expressão na Medicina Dentária.

A periodontite crónica apresenta um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, pelo que é de máximo interesse e importância compreender melhor os mecanismos pela qual a mesma é desenvolvida, de forma a conseguir atuar numa prevenção/controlo eficaz da doença.

Visto que a perda óssea é a consequência mais grave na periodontite crónica, é muito importante compreender os processos pela qual a mesma se desenvolve, de modo a conseguir atuar neste tão grande desafio da doença.

A importância do sistema RANKL/RANK/OPG na osteoclastogénese está bem estabelecida, e sabemos que RANKL é um dos fatores fundamentais para a formação e ativação dos osteoclastos e, consequentemente, da reabsorção óssea. Apesar disso, a complexidade dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos nesta interação ainda não estão bem definidos, pelo que é de extrema importância a continuação da investigação e realização de estudos nesta área.

Um maior esclarecimento destes mecanismos e a sua relação com a reabsorção óssea na periodontite crónica permite-nos estar mais perto do desenvolvimento de novas terapias para o tratamento da doença, o que irá melhorar em muito a saúde oral e qualidade de vida dos nossos doentes e será um grande avanço para a Medicina Dentária.

#### IV. BIBLIOGRAFIA

- Abusleme, L., Dupuy, A. K., Dutzan, N., Silva, N., Burleson, J. A., Strausbaugh, L. D., ... Diaz, P. I. (2013). The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. *Isme J*, 7(5), 1016–1025. <http://doi.org/ismej2012174> [pii]r10.1038/ismej.2012.174
- Aeschlimann, D., & Evans, B. a J. (2004). The vital osteoclast: how is it regulated? *Cell Death and Differentiation*, 11, S5–S7. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401470>
- Aliprantis, A. O., Ueki, Y., Sulyanto, R., Park, A., Sigrist, K. S., Sharma, S. M., ... Glimcher, L. H. (2008). NFATc1 in mice represses osteoprotegerin during osteoclastogenesis and dissociates systemic osteopenia from inflammation in cherubism. *Journal of Clinical Investigation*, 118(11), 3775–3789. <http://doi.org/10.1172/JCI35711>
- Anderson, D. M., Maraskovsky, E., Billingsley, W. L., Dougall, W. C., Tometsko, M. E., Roux, E. R., ... Galibert, L. (1997). A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656), 175–179. <http://doi.org/10.1038/36593>
- Antonini, R., Cancellier, K., Ferreira, G. K., & Scaini, G. (2013). Fisiopatologia da Doença Periodontal, 2, 90–107.
- Bar-Shavit, Z. (2007). The osteoclast: A multinucleated, hematopoietic-origin, bone-resorbing osteoimmune cell. *Journal of Cellular Biochemistry*, 102(5), 1130–1139. <http://doi.org/10.1002/jcb.21553>
- Bartold, P. M., & Narayanan, a. S. (2006). Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol 2000*, 40(1), 29–49. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2005.00140.x>
- Berglundh, T., Donati, M., & Zitzmann, N. (2007). B cells in periodontitis—friends or enemies? *Periodontology 2000*, 45, 51–66. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2007.00223.x>
- Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., & Martin-Third, T. J. (2008). Principles of Bone Biology, Two-Volume Set, Third Edition-Academic Press.
- Bonewald, L. F. (2007). Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1116, 281–290. <http://doi.org/10.1196/annals.1402.018>
- Bonewald, L. F. (2011). The amazing osteocyte. *Journal of Bone and Mineral Research*, 26(2), 229–238. <http://doi.org/10.1002/jbmr.320>

- Bostanci, N., Ilgenli, T., Emingil, G., Afacan, B., Han, B., Toz, H., ... Belibasakis, G. N. (2007). Gingival crevicular fluid levels of RANKL and OPG in periodontal diseases: Implications of their relative ratio. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(5), 370–376. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2007.01061.x>
- Boyle, W. J., Simonet, W. S., & Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation, 423(May), 337–342.
- Bronner, F., Farach-Carson, M. C., & Rubin, J. (2005). *Bone Resorption. Statewide Agricultural Land Use Baseline 2015* (Vol. 2 - Topics). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Bruzzaniti, A., & Baron, R. (2006). Molecular regulation of osteoclast activity. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 7(1-2), 123–139. <http://doi.org/10.1007/s11154-006-9009-x>
- Buduneli, N., & Kinane, D. F. (2011). Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 38(SUPPL. 11), 85–105. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01670.x>
- Burr, D. B., & Allen, M. R. (2014). *Basic and Applied Bone Biology*.
- Chakravarti, A., Raquil, M. A., Tessier, P., & Poubelle, P. E. (2009). Surface RANKL of Toll-like receptor 4-stimulated human neutrophils activates osteoclastic bone resorption. *Blood*, 114(8), 1633–1644. <http://doi.org/10.1182/blood-2008-09-178301>
- Chen, B., Wu, W., Sun, W., Zhang, Q., Yan, F., & Xiao, Y. (2014). RANKL expression in periodontal disease: Where does RANKL Come from? *BioMed Research International*, 2014. <http://doi.org/10.1155/2014/731039>
- Choi, Y. (2010). *Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems II - Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 658). <http://doi.org/10.1007/978-1-4419-1050-9>
- Cochran, D. L. (2008). Inflammation and bone loss in periodontal disease. *J Periodontol*, 79(8 Suppl), 1569–1576. <http://doi.org/10.1902/jop.2008.080233>
- Cortelli, J. R., Aquino, D. R., Cortelli, S. C., Fernandes, C. B., De Carvalho-Filho, J., Franco, G. C. N., ... Kawai, T. (2008). Etiological analysis of initial colonization of periodontal pathogens in oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(4), 1322–1329. <http://doi.org/10.1128/JCM.02051-07>
- Darveau, R. P. (2010). Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis.

- Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 481–90. <http://doi.org/10.1038/nrmicro2337>
- Darveau, R. P., Hajishengallis, G., & Curtis, M. a. (2012). Porphyromonas gingivalis as a potential community activist for disease. *J Dent Res*, 91(9), 816–820. <http://doi.org/0022034512453589> [pii]r10.1177/0022034512453589
- Di Benedetto, A., Gigante, I., Colucci, S., & Grano, M. (2013). Periodontal disease: Linking the primary inflammation to bone loss. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. <http://doi.org/10.1155/2013/503754>
- Dougall, W. C., Glaccum, M., Charrier, K., Rohrbach, K., Brasel, K., De Smedt, T., ... Schuh, J. (1999). RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes and Development*, 13(18), 2412–2424. <http://doi.org/10.1101/gad.13.18.2412>
- Durham, J., Fraser, H. M., McCracken, G. I., Stone, K. M., John, M. T., & Preshaw, P. M. (2013). Impact of periodontitis on oral health-related quality of life. *Journal of Dentistry*, 41(4), 370–376. <http://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.01.008>
- Feng, X., & McDonald, J. M. (2011). Disorders of Bone Remodeling, 121–145. <http://doi.org/10.1146/annurev-pathol-011110-130203>. Disorders
- Flemming, T. F. (1999). Periodontitis. *Ann Periodontol*, 4(1), 32–37. <http://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113046>
- Fujihara, R., Usui, M., Yamamoto, G., Nishii, K., Tsukamoto, Y., Okamatsu, Y., ... Yamamoto, M. (2013). Tumor necrosis factor- $\alpha$  enhances RANKL expression in gingival epithelial cells via protein kinase A signaling. *Journal of Periodontal Research*, 508–517. <http://doi.org/10.1111/jre.12131>
- Gaffen, S. L., & Hajishengallis, G. (2008). A new inflammatory cytokine on the block: re-thinking periodontal disease and the Th1/Th2 paradigm in the context of Th17 cells and IL-17. *Journal of Dental Research*, 87(9), 817–28. <http://doi.org/10.1177/154405910808700908>
- Garlet, G. P. (2010). Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, 89(12), 1349–63. <http://doi.org/10.1177/0022034510376402>
- Garlet, G. P., Cardoso, C. R., Silva, T. A., Ferreira, B. R., Ávila-Campos, M. J., Cunha, F. Q., & Silva, J. S. (2006). Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by Actinobacillus actinomycetemcomitans through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. *Oral Microbiology and Immunology*, 21(1), 12–20.

- <http://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2005.00245.x>
- Gemmell, E., Yamazaki, K., & Seymour, G. J. (2007). The role of T cells in periodontal disease: Homeostasis and autoimmunity. *Periodontology 2000*, 43(1), 14–40.  
<http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00173.x>
- Genco, R. J., & Borgnakke, W. S. (2013). Risk factors for periodontal disease. *Periodontology 2000*, 62, 59–94. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2012.00457.x>
- Graves, D. T., & Cochran, D. (2003). The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *The Journal of Periodontology*, 74(3), 391–401. <http://doi.org/10.1902/jop.2003.74.3.391>
- Hajishengallis, G. (2014). Immunomicrobial pathogenesis of periodontitis: Keystones, pathobionts, and host response. *Trends in Immunology*, 35(1), 3–11.  
<http://doi.org/10.1016/j.it.2013.09.001>
- Hajishengallis, G., Darveau, R., & Curtis, M. (2012). The Keystone Pathogen Hypothesis. *Nat Rev Microbiol*, 10(10), 717–725.  
<http://doi.org/10.1038/nrmicro2873>.The
- Hajishengallis, G., & Lamont, R. J. (2012). Beyond the red complex and into more complexity: The polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Molecular Oral Microbiology*, 27(6), 409–419.  
<http://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2012.00663.x>
- Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M. A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskan, M. A., ... Curtis, M. A. (2011). Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. *Cell Host and Microbe*, 10(5), 497–506. <http://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.006>
- Han, X., Kawai, T., & Taubman, M. A. (2007). Interference with immune- cell-mediated bone resorption in periodontal disease, 45, 76–94.  
<https://www.healthplexus.net/article/bone-biology-and-role-rankranklpg-pathway>
- Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, a, Silva, N., ... Gamonal, J. (2011). Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis. *Journal of Dental Research*, 90(10), 1164–1170.  
<http://doi.org/10.1177/0022034511401405>
- Hienz, S. A., Paliwal, S., & Ivanovski, S. (2015). Mechanisms of bone resorption in periodontitis. *Journal of Immunology Research*, 2015.  
<http://doi.org/10.1155/2015/615486>
- Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian*

- Dental Journal*, 54 Suppl 1, S11–26. <http://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x>
- Hsu, H., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Solovyev, I., Colombero, A., Timms, E., ... Boyle, W. J. (1999). Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3540–5. <http://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3540>
- Jaedicke, K. M., Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2016). Salivary cytokines as biomarkers of periodontal diseases. *Periodontology 2000*, 70(1), 164–183. <http://doi.org/10.1111/prd.12117>
- Jules, J., Ashley, J. W., & Feng, X. (2010). Selective Targeting of RANK Signaling Pathways as New Therapeutic Strategies for Osteoporosis. *Annales de Medecine Interne*, 151(9), 471–476. <http://doi.org/10.1517/14728222.2010.511179>
- Kajiya, M., Giro, G., Taubman, M. A., Han, X., Mayer, M. P. A., & Kawai, T. (2010). Role of periodontal pathogenic bacteria in RANKL-mediated bone destruction in periodontal disease. *Journal of Oral Microbiology*, 2(2010), 1–16. <http://doi.org/10.3402/jom.v2i0.5532>
- Kawai, T., Matsuyama, T., Hosokawa, Y., Makihiro, S., Seki, M., Karimbux, N. Y., ... Taubman, M. A. (2006). B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*, 169(3), 987–998. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2006.060180>
- Kim, J., & Kim, N. (2016). Signaling Pathways in Osteoclast Differentiation. *Chonnam Medical Journal*, 52, 12–17.
- Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., ... Penninger, J. M. (1999). OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397(6717), 315–323. <http://doi.org/10.1038/16852>
- Kular, J., Tickner, J., Chim, S. M., & Xu, J. (2012). An overview of the regulation of bone remodelling at the cellular level. *Clinical Biochemistry*, 45(12), 863–873. <http://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2012.03.021>
- Kye, W., Davidson, R., Martin, J., & Engebretson, S. (2012). Current status of periodontal risk assessment. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 12(3 SUPPL.), 2–11. [http://doi.org/10.1016/S1532-3382\(12\)70002-7](http://doi.org/10.1016/S1532-3382(12)70002-7)
- Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., ...

- Boyle, W. J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2), 165–176. [http://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81569-X](http://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81569-X)
- Lerner, U. H. (2004). New Molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption, 15(2), 64–81.
- Lewiecki, E. M., Miller, P. D., McClung, M. R., Cohen, S. B., Bolognese, M. a, Liu, Y., ... Fitzpatrick, L. a. (2007). Two-year treatment with denosumab (AMG 162) in a randomized phase 2 study of postmenopausal women with low BMD. *Journal of Bone and Mineral Research : The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 22(12), 1832–1841. <http://doi.org/10.1359/jbmr.070809>
- Li, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., ... Boyle, W. J. (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1566–71. <http://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1566>
- Lin, J., Bi, L., Yu, X., Kawai, T., Taubman, M. A., Shen, B., & Han, X. (2014). Porphyromonas gingivalis exacerbates ligature-induced, RANKLdependent alveolar bone resorption via differential regulation of Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4. *Infection and Immunity*, 82(10), 4127–4134. <http://doi.org/10.1128/IAI.02084-14>
- Lin, X., Han, X., Kawai, T., & Taubman, M. A. (2011). Antibody to receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand ameliorates T cell-mediated periodontal bone resorption. *Infection and Immunity*, 79(2), 911–917. <http://doi.org/10.1128/IAI.00944-10>
- Lindhe, J. (2008). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry - 5th edition*.
- Lindhe, J., Ranney, R., Lamster, I., Charles, A., Chung, C.-P., Flemmig, T., ... Somerman, M. (1999). Consensus Report: Chronic Periodontitis. *Annals of Periodontology the American Academy of Periodontology*, 4(1), 38. <http://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.38>
- Liu, B. S., Cao, Y., Huizinga, T. W., Hafler, D. A., & Toes, R. E. M. (2014). TLR-mediated STAT3 and ERK activation controls IL-10 secretion by human B cells. *European Journal of Immunology*, 44(7), 2121–2129. <http://doi.org/10.1002/eji.201344341>



- Lorenzo, J., Horowitz, M. C., Choi, Y., Takayanagi, H., & Schett, G. (2015). *Osteoimmunology: Interactions of the Immune and Skeletal Systems. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).  
<http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Lu, H.-K., Chen, Y.-L., Chang, H.-C., Li, C.-L., & Kuo, M. Y.-P. (2006). Identification of the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 41(4), 354–60. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00883.x>
- Martin, T. J., & Seeman, E. (2007). New mechanisms and targets in the treatment of bone fragility. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 112(2), 77–91.  
<http://doi.org/10.1042/CS20060046>
- Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood*, 111(2), 485–491.  
<http://doi.org/10.1182/blood-2007-03-079681>
- Miller, P. D. (2009). Denosumab: Anti-RANKL antibody. *Current Osteoporosis Reports*, 7(1), 18–22. <http://doi.org/10.1007/s11914-009-0004-5>
- Newman, M. G., Takei, H. H., Klokkevold, P. R., & Carranza, F. A. (2015). *Carranza's Clinical Periodontology - 12th Edition. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53). <http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Ohlrich, E. J., Cullinan, M. P., & Seymour, G. J. (2009). The immunopathogenesis of periodontal disease. *Australian Dental Journal*, 54, S2–S10.  
<http://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01139.x>
- Okamoto, K., & Takayanagi, H. (2011). Regulation of bone by the adaptive immune system in arthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 13(3), 219.  
<http://doi.org/10.1186/ar3323>
- Petersen, P. E., & Ogawa, H. (2012). The global burden of periodontal disease: Towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontology 2000*, 60(1), 15–39. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00425.x>
- Pietschmann, P. (2012). *Principles of Osteoimmunology. Journal of Chemical Information and Modeling* (Vol. 53).  
<http://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., & Johnson, N. W. (2005). Periodontal diseases. *Lancet*, 366(9499), 1809–1820. [http://doi.org/S0140-6736\(05\)67728-8](http://doi.org/S0140-6736(05)67728-8)  
[pii]r10.1016/S0140-6736(05)67728-8

- Preshaw, P. M., & Taylor, J. J. (2011). How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *Journal of Clinical Periodontology*, 38(SUPPL. 11), 60–84.  
<http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01671.x>
- Raggatt, L. J., & Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 285(33), 25103–25108.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.R109.041087>
- Rincon, M. (2012). Interleukin-6: From an inflammatory marker to a target for inflammatory diseases. *Trends in Immunology*, 33(11), 571–577.  
<http://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.003>
- Round, J. L., & Mazmanian, S. K. (2009). The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nature Rev Immunology*, 9(May), 313–324.  
<http://doi.org/10.1038/nri2515>
- Sarlati, F., Sattari, M., Razzaghi, S., & Nasiri, M. (2012). Receptor activator of nuclear factor kappa B ligand and osteoprotegerin levels in gingival crevicular fluid, 9(6).
- Silva, N., Abusleme, L., Bravo, D., Dutzan, N., Garcia-Sesnich, J., Vernal, R., ... Gamonal, J. (2015). Host response mechanisms in periodontal diseases. *Journal of Applied Oral Science*, 23(3), 329–55. <http://doi.org/10.1590/1678-775720140259>
- Socransky, S. S., Haffajee, a D., Cugini, M. a, Smith, C., & Kent, R. L. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134–144. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051X.1998.tb02419.x>
- Tabari, Z. A., Azadmehr, A., Tabrizi, M. A. A., Hamissi, J., & Ghaedi, F. B. (2013). Salivary soluble receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin ratio in periodontal disease and health. *Journal of Periodontal & Implant Science*, 43(5), 227–32. <http://doi.org/10.5051/jpis.2013.43.5.227>
- Taubman, M. A., & Kawai, T. (2001). Involvement of T-Lymphocytes in Periodontal Disease and in Direct and Indirect Induction of Bone Resorption. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 12(2), 125–135.  
<http://doi.org/10.1177/10454411010120020301>
- Taylor, J. J. (2014). Protein Biomarkers of Periodontitis in Saliva. *ISRN Inflammation*, 2014(Cvd), 1–18. <http://doi.org/10.1155/2014/593151>
- Teitelbaum, S. L. (2007). Osteoclasts: what do they do and how do they do it? *Am J Pathol*, 170(2), 427–435. <http://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060834>
- Tobón-Arroyave, S. I., Isaza-Guzmán, D. M., Restrepo-Cadavid, E. M., Zapata-Molina,

- S. M., & Martínez-Pabón, M. C. (2012). Association of salivary levels of the bone remodelling regulators sRANKL and OPG with periodontal clinical status. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(12), 1132–1140. <http://doi.org/10.1111/jcpe.12012>
- Trombelli, L., Tatakis, D. N., Scapoli, C., Bottega, S., Orlandini, E., & Tosi, M. (2004). Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis: II. Identification of “high-responder” and “low- Responder” subjects. *Journal of Clinical Periodontology*, 31(4), 239–252. <http://doi.org/10.1111/j.1600-051x.2004.00478.x>
- Udagawa, N., Sato, N., Yang, S., Nakamura, M., Yamashita, T., Nakamura, H., & Noguchi, T. (2007). Signal transduction of lipopolysaccharide-induced osteoclast differentiation. *Periodontology 2000*, 43(1), 56–64. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00167.x>
- Van Dyke, T. E. (2008). Inflammation and periodontal diseases: a reappraisal. *Journal of Periodontology*, 79(8 Suppl), 1501–2. <http://doi.org/10.1902/jop.2008.080279>
- Van Dyke, T. E., & Kornman, K. S. (2008). Inflammation and factors that may regulate inflammatory response. *The Journal of Periodontology*, 79(8 Suppl), 1503–1507. <http://doi.org/10.1902/jop.2008.080239>
- Vernal, R., Dutzan, N., Hernández, M., Chandía, S., Puente, J., León, R., ... Gamonal, J. (2006). High expression levels of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand associated with human chronic periodontitis are mainly secreted by CD4+ T lymphocytes. *Journal of Periodontology*, 77(10), 1772–80. <http://doi.org/10.1902/jop.2006.050376>
- Wang, G. P. (2015). Defining functional signatures of dysbiosis in periodontitis progression. *Genome Medicine*, 7(1), 40. <http://doi.org/10.1186/s13073-015-0165-z>
- Wang, Y. H., Jiang, J., Zhu, Q., AlAnezi, A. Z., Clark, R. B., Jiang, X., ... Nichols, F. C. (2010). Porphyromonas gingivalis lipids inhibit osteoblastic differentiation and function. *Infection and Immunity*, 78(9), 3726–3735. <http://doi.org/10.1128/IAI.00225-10>
- Wong, B. R. E. A. (1997). TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J. Biol. Chem* 1997; 272: 25190–25194. *J. Biol. Chem*, 272(40), 25190–25194. <http://doi.org/10.1074/jbc.272.40.25190>
- Xu, F., & Teitelbaum, S. L. (2013). Osteoclasts: New Insights. *Bone Research*, 1(1), 11–26. <http://doi.org/10.4248/BR201301003>

- Xu, J., Wu, H. F., Ang, E. S. M., Yip, K., Woloszyn, M., Zheng, M. H., & Tan, R. X. (2009). NF- $\kappa$ B modulators in osteolytic bone diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(1), 7–17. <http://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2008.11.007>
- Yarilina, A., Xu, K., Chen, J., & Ivashkiv, L. B. (2011). TNF activates calcium-nuclear factor of activated T cells (NFAT)c1 signaling pathways in human macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1573–1578. <http://doi.org/10.1073/pnas.1010030108>
- Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., ... Suda, T. (1998). Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(7), 3597–602. <http://doi.org/10.1073/pnas.95.7.3597>
- Yucel-Lindberg, T., & Båge, T. (2013). Inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontitis. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 15(August), e7. <http://doi.org/10.1017/erm.2013.8>
- Zou, W., & Teitelbaum, S. L. (2010). Integrins, growth factors, and the osteoclast cytoskeleton. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1192, 27–31. <http://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05245.x>